illumina®

Guia de referência do instrumento MiSeq FGx™

APENAS PARA PESQUISA, PERÍCIA OU PATERNIDADE

PROPRIEDADE DA ILLUMINA
Componente # 15050524 Rev. C PTB
Fevereiro de 2015

Catálogo # SY-411-9001DOC

Este documento e seu conteúdo são propriedade da Illumina, Inc. e suas afiliadas ("Illumina"), e destinam-se exclusivamente ao uso contratual de seu cliente com relação ao uso dos produtos descritos neste documento e para nenhuma outra finalidade. Este documento e seu conteúdo não serão usados ou distribuídos para nenhuma outra finalidade e/ou comunicados, divulgados ou reproduzidos em nenhuma forma sem o consentimento prévio por escrito da Illumina. A Illumina não transmite nenhuma licença sob seus direitos de patente, marca registrada, direitos autorais ou lei comum nem direitos semelhantes de terceiros por este documento.

As instruções neste documento devem ser estrita e explicitamente seguidas por pessoal devidamente treinado e qualificado para garantir o uso adequado e seguro dos produtos descritos neste documento. Todo o conteúdo deste documento deve ser inteiramente lido e entendido antes da utilização de tais produtos.

NÃO LER COMPLETAMENTE E NÃO SEGUIR EXPLICITAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES AQUI CONTIDAS PODE RESULTAR EM DANOS AOS PRODUTOS, FERIMENTOS A PESSOAS, INCLUINDO USUÁRIOS OU OUTROS, E DANOS A OUTROS BENS.

A ILLUMINA NÃO ASSUME NENHUMA RESPONSABILIDADE RESULTANTE DA UTILIZAÇÃO INDEVIDA DOS PRODUTOS AQUI DESCRITOS (INCLUINDO SUAS PARTES OU SEU SOFTWARE) OU DE QUALQUER USO DE TAIS PRODUTOS FORA DO ESCOPO DAS LICENÇAS EXPRESSAS POR ESCRITO OU PERMISSÕES CONCEDIDAS PELA ILLUMINA EM CONEXÃO COM A AQUISIÇÃO DE TAIS PRODUTOS POR PARTE DO CLIENTE.

PARA USO EXCLUSIVO EM PESQUISAS, ANÁLISES FORENSES OU DE PATERNIDADE

© 2015 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

Illumina, **24sure**, **BaseSpace**, **BeadArray**, **BlueFish**, **BlueFuse**, **BlueGnome**, **cBot**, **CSPro**, **CytoChip**, **DesignStudio**, **Epicentre**, **GAIIx**, **Genetic Energy**, **Genome Analyzer**, **GenomeStudio**, **GoldenGate**, **HiScan**, **HiSeq**, **HiSeq X**, **Infinium**, **iScan**, **iSelect**, **ForenSeq**, **MiSeq FGx**, **NeoPrep**, **Nextera**, **NextBio**, **NextSeq**, **Powered by Illumina**, **SeqMonitor**, **SureMDA**, **TruGenome**, **TruSeq**, **TruSight**, **Understand Your Genome**, **UYG**, **VeraCode**, **verifi**, **VeriSeq**, a cor de abóbora e o desenho de sequências de DNA onduladas são marcas registradas da Illumina, Inc. e/ou de seus afiliados nos Estados Unidos e/ou em outros países. Todos os outros nomes, logotipos e marcas são de propriedade de seus respectivos proprietários.

Leia antes de usar o produto

Este Produto, seu uso e descarte estão sujeitos aos seguintes termos e condições. Caso não concorde com estes termos e condições, o Comprador não tem autorização da Illumina para usar o Produto, de modo que não deverá usá-lo.

1 **Definições**. "**PI Específica de Aplicação**" significa os direitos de propriedade intelectual da Illumina ou controlados por ela que se aplicam a este Produto (e a seu uso) somente no que diz respeito a campos ou aplicações específicas. A PI de Aplicação Específica exclui toda a propriedade intelectual da Illumina ou controlada por ela que abranja características ou recursos deste Produto (ou seu uso) comuns a todas as aplicações e campos de uso possíveis ("**PI Principal**"). A PI de Aplicação Específica e a PI Principal são subconjuntos independentes, que não se sobrepõem, de toda a propriedade intelectual da Illumina ou controlada por ela. A título de exemplos não taxativos, os direitos de propriedade intelectual da Illumina para métodos de diagnósticos específicos, métodos forenses específicos ou biomarcadores, sequências ou combinações de biomarcadores e sequências de ácido nucleico específicos são casos de PI de Aplicação Específica. "**Materiais de Consumo**" significa reagentes e itens de consumo da marca Illumina desenvolvidos para serem usados com o Hardware e consumidos por meio do uso do Hardware. "**Documentação**" significa o manual do usuário desenvolvido pela Illumina para este Produto, incluindo, entre outros, encartes e qualquer outra documentação que acompanhe este Produto ou seja mencionada por ele ou em sua embalagem e que esteja em vigor na data de envio pela Illumina. A Documentação inclui este documento. "**Hardware**" significa instrumentos, acessórios ou periféricos da marca Illumina. "**Illumina**" significa Illumina, Inc. ou uma de suas afiliadas, conforme o caso. "**Produto**" significa o produto que acompanha este documento (por exemplo, Hardware, Materiais de Consumo ou Software). "**Comprador**" é a pessoa física ou jurídica que adquire jurídica e legitimamente o Produto da Illumina ou de um revendedor autorizado. "**Software**" significa software da marca Illumina (por exemplo, software de operação de Hardware, software de análise de dados). Todo Software é licenciado, e não vendido, e pode estar sujeito a outros termos encontrados em contratos de licença de usuário final específicos de um Software. "**Especificações**" significa especificações escritas da Illumina para este Produto em vigor na data em que o Produto é enviado pela Illumina.

2 **Direitos para uso exclusivo em pesquisas**. Sujeito a estes termos e condições, e salvo se acordado em contrário por escrito por um representante da Illumina, o Comprador recebe apenas um direito não exclusivo, intransferível, pessoal e impassível de sublicenciamento na PI Principal da Illumina existente na data em que essa envia o Produto, apenas para o uso deste Produto nas instalações do Comprador e para fins de suas pesquisas internas (que incluem serviços de pesquisa prestados a terceiros), atendo apenas à Documentação deste Produto, **mas excluindo especificamentequalquer uso que** (a) exigiria direitos ou uma licença da Illumina para PI de Aplicação Específica, (b) seja um reúso de um Material de Consumo, (c) seja a desmontagem, engenharia reversa, compilação reversa ou montagem reversa deste Produto, (d) seja a separação, a extração ou o isolamento de componentes deste Produto ou outras análises não autorizadas deste Produto, (e) obtenha acesso ou determine os métodos de operação deste Produto, (f) seja o uso de materiais de consumo/reagentes de outra marca que não Illumina com Hardware da Illumina (não aplicável se a Documentação ou as Especificações deste Produto definirem em contrário), ou (g) seja a transferência ou o sublicenciamento para um terceiro de um Software ou de qualquer software de outra empresa. Todo Software, não importando se é fornecido

separadamente, instalado em um Produto ou integrado a ele, é licenciado ao Comprador, e não vendido. Salvo conforme expressamente declarado nesta Seção, nenhum direito ou licença previstos nos direitos de propriedade intelectual da Illumina é concedido de forma expressa, implícita ou ato contraditório.

O Comprador é o único responsável por determinar se detém todos os direitos de propriedade intelectual necessários para os fins a que pretende destinar este Produto, incluindo, dentre outros, eventuais direitos de terceiros ou direitos a PI de Aplicação Específica. A Illumina não oferece nenhuma garantia de que os usos específicos pretendidos do Comprador não violarão os direitos de propriedade intelectual de terceiros ou da PI de Aplicação Específica.

3 **Regulamentação**. Este Produto não foi aprovado, liberado ou licenciado pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos nem por qualquer outro órgão regulador nacional ou estrangeiro para um uso pretendido específico, seja ele de pesquisa, comercial, diagnóstico ou de outra natureza. Este Produto tem a etiqueta For Research Use Only (Somente para pesquisa). O Comprador deve garantir que tem todas as aprovações regulatórias necessárias para o uso que pretende dar a este Produto.

4 **Usos não autorizados**. O Comprador concorda em: (a) usar apenas um Material de Consumo por vez, e (b) usar apenas materiais de consumo/reagentes da Illumina com Hardware da Illumina. As restrições nos itens (a)-(b) não se aplicam se a Documentação ou as Especificações deste Produto definirem em contrário. O Comprador concorda em não se envolver e em não autorizar o envolvimento de terceiros em nenhuma das atividades a seguir: (i) desmontagem, engenharia reversa, compilação reversa ou montagem reversa do Produto, (ii) separação, extração ou isolamento de componentes deste Produto ou sujeição deste Produto ou seus componentes a qualquer análise que não esteja expressamente autorizada na Documentação deste Produto, (iii) obtenção de acesso ou tentativa de determinar os métodos de operação deste Produto, ou (iv) transferência ou sublicenciamento a terceiros de qualquer Software ou software de outra empresa. O Comprador concorda ainda que o conteúdo e os métodos de operação deste Produto são exclusivos da Illumina e, portanto, este Produto contém ou reúne segredos comerciais da Illumina. As condições e restrições constantes destes termos e condições são negociadas até chegar às condições de venda e, depois, ao controle da venda e do uso deste Produto pelo Comprador.

5 **Responsabilidade limitada. NO LIMITE PERMITIDO PELA LEI, EM NENHUMA HIPÓTESE A ILLUMINA OU SEUS FORNECEDORES SERÃO RESPONSÁVEIS PERANTE O COMPRADOR OU QUALQUER TERCEIRO POR CUSTOS DE AQUISIÇÃO DE PRODUTOS OU SERVIÇOS DE SUBSTITUIÇÃO, LUCROS CESSANTES, PERDA DE DADOS OU NEGÓCIOS, NEM POR NENHUM DANO INDIRETO, ESPECIAL, INCIDENTAL, EXEMPLAR, CONSEQUENTE OU PUNITIVO DE QUALQUER NATUREZA DECORRENTE OU RELACIONADO, SEM LIMITAÇÕES, À VENDA DESTE PRODUTO, AO SEU USO, AO CUMPRIMENTO DAS OBRIGAÇÕES DA ILLUMINA NOS TERMOS DESTE DOCUMENTO OU DE QUALQUER DESTES TERMOS E CONDIÇÕES, POR MAIS QUE DECORRA OU SEJA CAUSADO POR ALGUMA TEORIA DE RESPONSABILIDADE CIVIL (SEJA ELA CONTRATUAL, PROVENIENTE DE ATO ILÍCITO (INCLUINDO CULPA), RESPONSABILIDADE CIVIL OBJETIVA OU OUTRA HIPÓTESE).**

6 **A RESPONSABILIDADE TOTAL E CUMULATIVA DA ILLUMINA PERANTE O COMPRADOR OU QUALQUER TERCEIRO DECORRENTE OU RELACIONADA A ESTES TERMOS E CONDIÇÕES, INCLUINDO, DENTRE OUTRAS COISAS, ESTE PRODUTO (E SEU USO) E O CUMPRIMENTO DAS OBRIGAÇÕES DA ILLUMINA NOS TERMOS DESTE DOCUMENTO, SEJA ELA CONTRATUAL, PROVENIENTE DE ATO ILÍCITO (INCLUINDO CULPA), RESPONSABILIDADE CIVIL OBJETIVA OU OUTRA HIPÓTESE, EM NENHUM CASO EXCEDERÁ O VALOR PAGO À ILLUMINA POR ESTE PRODUTO.**

7 **Limitações das garantias oferecidas pela Illumina. NO LIMITE PERMITIDO POR LEI E SUJEITA À GARANTIA EXPRESSA DO PRODUTO DAQUI CONSTANTE, A ILLUMINA NÃO APRESENTA NENHUMA GARANTIA (E EXPRESSAMENTE AFASTA TODAS ELAS), SEJA EXPRESSA, IMPLÍCITA OU LEGAL, EM RELAÇÃO A ESTE PRODUTO, INCLUINDO, DENTRE OUTRAS COISAS, QUALQUER GARANTIA IMPLÍCITA DE COMERCIABILIDADE, ADEQUAÇÃO PARA UM DETERMINADO FIM, INVIOLABILIDADE DE DIREITOS OU DECORRENTE DE CURSO DO CUMPRIMENTO DE CONTRATOS, NEGOCIAÇÕES, COSTUMES OU TRANSAÇÕES. SEM LIMITAR A GENERALIDADE DO PRECEDENTE, A ILLUMINA NÃO APRESENTA NENHUMA REIVINDICAÇÃO, DECLARAÇÃO OU GARANTIA DE QUALQUER NATUREZA QUANTO À UTILIDADE DESTE PRODUTO PARA OS USOS PRETENDIDOS DO COMPRADOR.**

8 **Garantia do Produto**. Todas as garantias são exclusivas do Comprador e não podem ser transferidas ou cedidas a terceiros, incluindo uma afiliada do Comprador. Todas as garantias são específicas para um local e não são transferidas se o Produto for transferido para outra instalação do Comprador, a menos que a Illumina conduza tal transferência.

a **Garantia de Materiais de Consumo**. A Illumina garante que Materiais de Consumo que não sejam personalizados atenderão às suas Especificações até o mais tardar entre (i) 3 meses a contar da data de envio pela Illumina, e (ii) qualquer data de expiração ou validade impressa pela Illumina em tais Materiais de Consumo, mas em nenhum caso em mais de 12 meses a contar da data de envio. Em relação aos Materiais de Consumo personalizados (isto é, Materiais de Consumo feitos de acordo com especificações ou projetos do Comprador ou fornecidos à Illumina pelo Comprador ou em nome dele), a Illumina garante apenas que os Materiais de Consumo personalizados serão feitos e testados de acordo com os seus processos padrão de fabricação e controle de qualidade. A Illumina não apresenta nenhuma garantia de que Materiais de Consumo personalizados funcionarão conforme a pretensão do Comprador ou para os usos pretendidos por ele.

b **Garantia de Hardware**. A Illumina garante que o Hardware, que não os Componentes Atualizados, atenderão às suas Especificações por um período de 12 meses após a data de envio da Illumina, salvo se o Hardware incluir instalação feita pela Illumina, caso no qual o período de garantia se inicia na data da instalação ou em 30 dias após a data de entrega, o que ocorrer primeiro ("Garantia Base de Hardware"). "Componentes Atualizados" significa componentes, modificações ou melhorias fornecidos pela Illumina ao Hardware previamente adquirido pelo Comprador. A Illumina garante que os Componentes Atualizados cumprirão suas Especificações por um período de 90 dias a contar da data de instalação dos Componentes Atualizados. Os Componentes Atualizados não estendem a garantia do Hardware, salvo se a atualização for conduzida pela Illumina, em suas instalações, caso no qual o Hardware atualizado enviado ao Comprador será acompanhado da Garantia Base de Hardware.

c **Exclusões da cobertura da garantia**. As garantias supracitadas não se aplicam se um descumprimento for decorrente de (i) abuso, uso incorreto, descuido, negligência, acidente, armazenamento inapropriado ou uso que vá de encontro à Documentação ou às Especificações, (ii) inadequação de manuseio, instalação, manutenção ou reparo (que não tenha sido executado por pessoal da Illumina), (iii) modificações não autorizadas, (iv) casos de Força Maior, ou (v) uso com um bem de terceiro não fornecido pela Illumina (salvo se a Documentação ou as Especificações do Produto definirem expressamente que tal bem de terceiro é para ser usado com o Produto).

d **Procedimento para cobertura da garantia**. Para ter direito a reparo ou substituição previstos nesta garantia, o Comprador deverá (i) entrar em contato imediato com o departamento de suporte da Illumina para informar a não conformidade, (ii) cooperar com a Illumina para confirmar ou diagnosticar a não conformidade, e (iii) devolver este Produto à Illumina, com os encargos de transporte pré-pagos, seguindo as instruções da Illumina ou, se acordado entre a Illumina e o Comprador, conceder acesso ao Produto a pessoal autorizado de assistência técnica da Illumina a fim de confirmar a não conformidade e realizar os reparos.

e **Único recurso previsto na garantia**. A Illumina, a seu critério, reparará ou substituirá Produto fora de conformidade que ela confirme estar coberto por esta garantia. Os Materiais de Consumo reparados ou substituídos têm garantia de 30 dias. O Hardware poderá ser reparado ou substituído por Hardware ou componentes com funcionamento equivalente, recondicionados ou novos (se apenas um componente do Hardware não estiver em conformidade). Se o Hardware for totalmente substituído, o período de garantia da substituição é de 90 dias a contar da data do envio ou o período remanescente da garantia original do Hardware, o que for mais curto. Se apenas um componente for reparado ou substituído, o período de garantia de tal componente é de 90 dias a contar da data do envio ou o período remanescente da garantia original do Hardware, o que tiver maior validade. O precedente define o único recurso do Comprador e as únicas obrigações da Illumina previstos nesta garantia.

f **Produtos e garantia de terceiros**. A Illumina não tem obrigações de garantia com relação a eventuais produtos de terceiros e fornecidos ao Comprador nos termos deste documento. Produtos de terceiros são aqueles com etiquetas ou marcas com o nome de um terceiro. A garantia para bens de terceiros, se houver, é fornecida pelo fabricante original. Mediante solicitação por escrito, a Illumina tentará repassar eventuais garantias para o Comprador.

9 **Indenização**.

a **Indenização por violação paga pela Illumina**. Sujeita a estes termos e condições, incluindo, dentre outros, as Exclusões às Obrigações de Indenização da Illumina (Seção 9(b) abaixo) e as Condições para Obrigações de Indenização (Seção 9(d) abaixo), a Illumina (i) defenderá, indenizará e isentará de responsabilidade o Comprador contra eventuais reivindicações ou ações de terceiros que aleguem que este Produto, quando usado apenas para fins de pesquisa, de acordo com estes termos e condições e com a Documentação e as Especificações deste Produto, viola direitos de propriedade intelectual válidos e legítimos de um terceiro, e (ii) pagará todos os acordos firmados, todas as decisões definitivas e todos os custos (inclusive honorários advocatícios razoáveis) definidos em face do Comprador em relação a tal ação de violação de direitos. Caso este Produto ou qualquer parte dele seja ou, a critério da Illumina, venha a ser objeto de uma ação de violação de direitos, a Illumina terá o direito, a seu critério de (A) providenciar ao Comprador o direito de continuar usando este Produto, (B) modificar ou substituir este Produto por outro substancialmente equivalente e que não viole direitos, ou (C) solicitar a devolução deste Produto, extinguindo os direitos, a licença e qualquer outra permissão dada ao Comprador com relação a este Produto e reembolsando ao Comprador o valor depreciado (conforme os registros oficiais do Comprador) do Produto devolvido no momento de tal devolução; fica estabelecido que nenhum reembolso será feito para Materiais de Consumo usados ou vencidos. Esta Seção define a responsabilidade total da Illumina por qualquer violação de direitos de terceiros.

b **Exclusões às obrigações de indenização da Illumina**. A Illumina não é obrigada a defender, indenizar ou isentar de responsabilidades o Comprador por eventuais Ações de violação de direitos da Illumina desde que tal violação decorra: (i) do uso deste Produto de qualquer forma ou para qualquer finalidade fora do escopo de uso em pesquisa, (ii) do uso deste Produto de qualquer forma que não esteja de acordo com suas Especificações, sua Documentação, os direitos expressamente aqui concedidos ao Comprador, ou qualquer violação cometida pelo Comprador em relação a estes termos e condições, (iii) do uso deste Produto junto com qualquer outro produto, material ou serviço não fornecido ou prestado pela Illumina, (iv) do uso deste Produto para executar um ensaio ou outro processo não fornecido pela Illumina ou (v) conformidade da Illumina com especificações ou instruções para este Produto fornecida pelo Comprador ou em nome dele (sendo cada um dos itens (i) – (v) mencionado como uma "Reivindicação excluída").

c **Indenização paga pelo Comprador**. O Comprador defenderá, indenizará e isentará de responsabilidade a Illumina, suas afiliadas e seus colaboradores e parceiros de desenvolvimento não afiliados que contribuíram para o desenvolvimento deste Produto, e seus respectivos representantes, diretores, agentes e empregados contra eventuais ações, responsabilidades, danos, multas, sanções, causas de pedir e perdas de qualquer natureza, incluindo, entre outras coisas, ações por lesões corporais ou morte e violação dos direitos de propriedade intelectual de um terceiro decorrente ou relacionado (i) à violação de qualquer destes termos e condições por parte do Comprador, (ii) ao uso

deste Produto pelo Comprador fora do escopo dos fins de pesquisa, (iii) a qualquer uso deste Produto que não esteja de acordo com as Especificações ou com a Documentação deste Produto, ou (iv) a qualquer Reivindicação excluída.

d **Condições para obrigações de indenização**. As obrigações de indenização das partes ficam condicionadas à parte que busca a indenização, tomando as seguintes providências: (i) notificar imediatamente a outra parte por escrito sobre tal reivindicação ou ação, (ii) dar à outra parte controle exclusivo e autoridade sobre a defesa e ao acordo de tal reivindicação ou ação, (iii) não admitir violação de nenhum direito de propriedade sem o consentimento prévio da outra parte, (iv) não firmar qualquer acordo ou compromisso em tal reivindicação ou ação sem o prévio consentimento por escrito da outra parte e (v) prestar a assistência razoável à outra parte na defesa da reivindicação ou ação; fica estabelecido que a parte reembolsará a parte indenizada por suas despesas diversas incorridas em tal assistência.

e **Produtos e indenização de terceiros**. A Illumina não tem obrigações de indenização com relação a eventuais produtos de terceiros e fornecidos ao Comprador. Produtos de terceiros são aqueles com etiquetas ou marcas com o nome de um terceiro. Os direitos de indenização do Comprador, se houver, em relação a produtos de terceiros serão de acordo com a indenização do fabricante ou licenciante original. Mediante solicitação por escrito, a Illumina tentará repassar tal indenização, se houver, para o Comprador.

Histórico das revisões

Nº de peça	Revisão	Data	Descrição da mudança
15050524_PTB	C	Fevereiro 2015	Erros de formatação corrigidos.
15050524	B	Janeiro de 2015	Apenas disponível em inglês. Atualização do nome do kit de reagentes de Kit de sequenciamento MiSeq ForenSeq para Kit de reagentes MiSeq FGx.
15050524	A	Outubro de 2014	Apenas disponível em inglês. Lançamento inicial.

Índice

Histórico das revisões vii
Índice ix

Capítulo 1 Introdução 1

Uso pretendido 2
Componentes 3
Inicialização do MiSeq FGx 6
Materiais de consumo necessários 7

Capítulo 2 MiSeq FGx Software 9

Introdução 10
MiSeq FGx Control Software 11
Opções do software de análise para execuções RUO 35

Capítulo 3 Realização de uma execução 37

Introdução 38
MiSeq FGx Fluxo de trabalho 39
Preparação do cartucho de reagentes 41
Login e seleção do tipo de execução 44
Limpeza da lâmina de fluxo 45
Carregamento da lâmina de fluxo 47
Carregamento de reagentes 49
Início da execução 51
Monitoramento da execução 52

Capítulo 4 Procedimentos da manutenção 53

Introdução 54
Realização de uma limpeza pós-execução 55
Realização de uma limpeza de manutenção 58
Realização de uma limpeza de espera 61
Desligamento do instrumento 63

Capítulo 5 Solução de problemas 65

Introdução 66
Resolução dos erros de configuração da execução 67
Resolução da falha de leitura do RFID 68
Evitar reinícios durante uma execução 70
Solução de problemas de erro de taxa de fluxo 71
Realização de um teste de volume 72
Medição dos volumes de limpeza esperados 74

Índice remissivo 75

Assistência técnica 77

Introdução

Capítulo 1

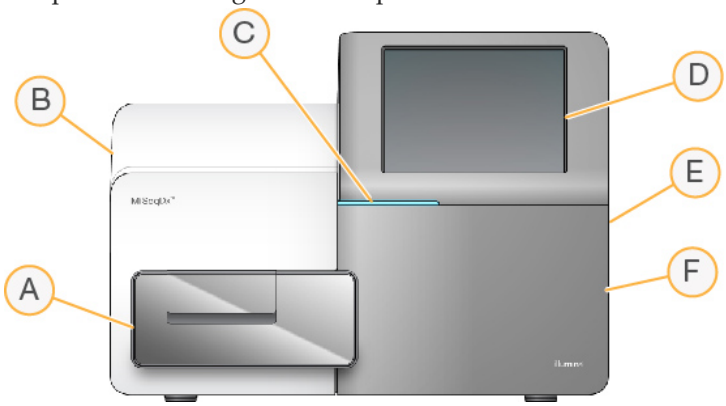
Uso pretendido 2
Componentes 3
Inicialização do MiSeq FGx 6
Materiais de consumo necessários 7

Uso pretendido

O MiSeq FGx é um instrumento de sequenciamento que mede os sinais de fluorescência de nucleotídeos marcados por meio de reagentes específicos do instrumento e lâminas de fluxo, hardware de imagens e software de análise de dados. O MiSeq FGx, como parte do MiSeq Forensic Genomics System, serve para sequenciamento direcionado de DNA para estudos de caso forenses, banco de dados e outras aplicações de identificação humana. O MiSeq FGx também apresenta um modo RUO (Research Use Only - Somente para pesquisa). O modo RUO funciona com todos os kits de preparação de biblioteca de RUO do Illumina compatíveis com o MiSeq.

Componentes

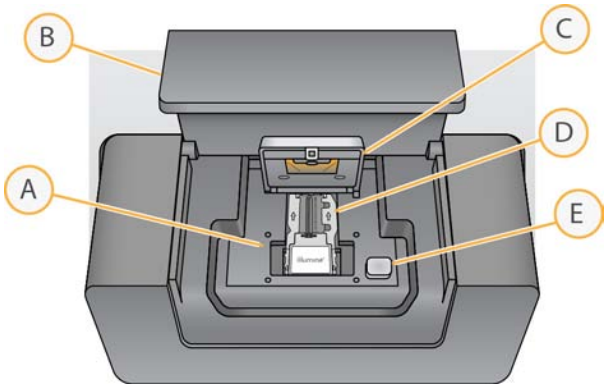
O MiSeq FGx tem os seguintes componentes externos:



- **A** **Compartimento da lâmina de fluxo**: contém a plataforma que abriga a lâmina de fluxo durante a execução. Os motores da plataforma da lâmina de fluxo movem a plataforma para fora do módulo ótico para o carregamento da lâmina de fluxo e retorna-a quando a execução é iniciada.
- **B** **Módulo ótico fechado**: contém componentes óticos que permitem a aquisição da imagem da lâmina de fluxo.
- **C** **Barra de status**: usa três cores para indicar o status do instrumento. A cor azul indica que o instrumento está processando, laranja indica que o instrumento precisa de atenção e verde indica que o instrumento está pronto para começar a próxima execução.
- **D** **Monitor da tela de toque**: permite a configuração no instrumento e a configuração da execução com o uso da interface do software.
- **E** **Porta USB externa**: facilita a transferência de arquivos e dados para o computador do instrumento a partir do monitor da tela de toque.
- **F** **Compartimento de reagentes**: contém reagentes em temperaturas adequadas, soluções de limpeza e o frasco de resíduos. A porta do compartimento de reagentes é protegida por uma trava magnética.

A interface do MiSeq FGx orienta os usuários nas etapas de configuração da execução usando o monitor da tela de toque.

Compartimento da lâmina de fluxo

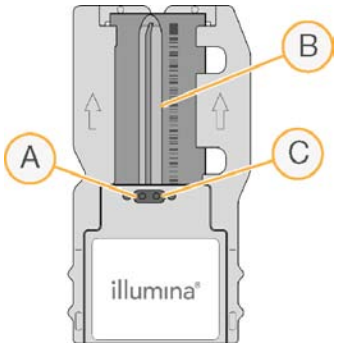


A Plataforma da lâmina de fluxo
B Porta do compartimento da lâmina de fluxo
C Trava da lâmina de fluxo
D Lâmina de fluxo
E Botão para liberação da trava da lâmina de fluxo

O compartimento da lâmina de fluxo abriga a plataforma, a estação térmica e as conexões de fluxo de reagentes para a lâmina de fluxo. A plataforma da lâmina de fluxo segura a lâmina de fluxo e trava da lâmina de fluxo prende e posiciona a lâmina de fluxo. Quando a trava da lâmina de fluxo é fechada, dois pinos próximos à dobradiça da trava posicionam a lâmina de fluxo automaticamente.

A estação térmica, localizada sob a plataforma, controla as alterações na temperatura da lâmina de fluxo, necessárias para a clusterização e o sequenciamento.

Lâmina de fluxo



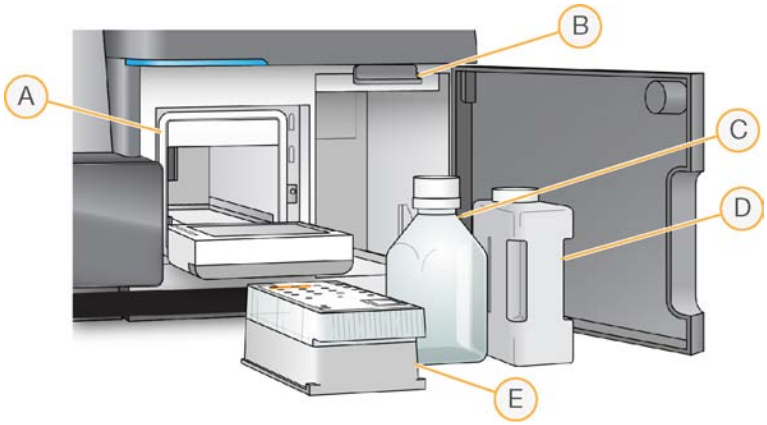
A Porta de saída
B Área de imagem
C Porta de entrada

A lâmina de fluxo do MiSeq FGx é um substrato descartável com base em vidro no qual são gerados os clusters e é executada a reação de sequenciamento.

Os reagentes entram na lâmina de fluxo através da porta de entrada, passam pela área de imagem de canaleta única e, em seguida, saem da lâmina de fluxo pela porta de saída. Os resíduos que saem da lâmina de fluxo são colocados no frasco de resíduos.

Durante a execução de sequenciamento, são feitas imagens da canaleta única em pequenas áreas chamadas de blocos.

Compartimento de reagentes



A Refrigerador dos reagentes
B Alça do aspirador de líquidos (mostrada na posição levantada)
C Frasco de Solução SBS (PR2)
D Frasco de resíduos
E MiSeq FGx Cartucho de reagentes

O compartimento de reagentes contém o refrigerador de reagentes e as posições do frasco de Solução SBS (PR2) e do frasco de resíduos.

Durante a execução, o refrigerador de reagentes mantém um cartucho de reagentes descartável. Durante a limpeza do instrumento, o refrigerador de reagentes sustenta a bandeja de limpeza. O programa automaticamente abaixa os aspiradores de líquidos em cada reservatório do cartucho de reagentes no momento apropriado durante uma execução, dependendo do processo que está sendo executado.

À direita do refrigerador de reagentes há duas aberturas, uma para o frasco de Solução SBS (PR2) e outra para o frasco de resíduos. A alça do aspirador de líquidos mantém as garrafas no lugar e abaixa o aspirador de líquidos apropriado em cada frasco.

Os reagentes são bombeados pelo aspirador de líquidos e pelas linhas de fluxo de reagentes e seguem para a lâmina de fluxo. Os resíduos do reagente são colocados no frasco de resíduos durante todo o processo.

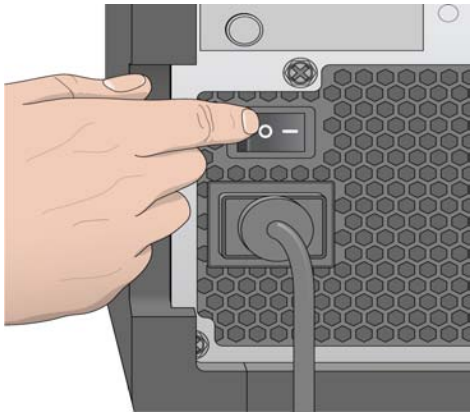
Inicialização do MiSeq FGx

OBSERVAÇÃO

A Illumina recomenda que você deixe o instrumento ligado continuamente. No entanto, se o instrumento tiver que ser desligado, siga o procedimento descrito em *Desligamento do instrumento* na página 63. Espere no ***mínimo*** 60 segundos antes de colocar o interruptor na posição ON (ligado).

1 Se o MiSeq FGx não estiver já ligado, localize o interruptor do instrumento no painel traseiro à direita. Ele está localizado no canto inferior, logo acima do cabo de energia.

Figura 1 Localização do interruptor



2 Coloque o interruptor na posição **ON (ligado)**. O computador do instrumento integrado será iniciado.

3 Faça login no sistema operacional.
Espere até que o sistema operacional termine de carregar. O MiSeq FGx Control Software é ativado e inicializa o instrumento automaticamente.

4 Após a conclusão da etapa de inicialização, faça login usando seu nome de usuário e sua senha do ForenSeq Universal Analysis Software.

Figura 2 Tela de login

Illumina MiSeq FGx
Enter your ForenSeq UAS username and password.
Email:
Password:
If you do not have an account, please contact your facility administrator.
Next

5 Clique em **Next (Próximo)**. A tela Welcome (Boas-vindas) será aberta. Consulte a *Tela Welcome (Boas-vindas)* na página 11.

Materiais de consumo necessários

Materiais de consumo para sequenciamento

Os materiais de consumo para sequenciamento necessários para a execução do MiSeq FGx são fornecidos separadamente.

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário

Os materiais de consumo fornecidos pelo usuário a seguir devem estar disponíveis antes do início de uma execução.

Material de consumo	Fornecedor	Finalidade
Compressa com álcool, 70% isopropílico ou 70% etílico	VWR, nº do catálogo 95041-714* Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Limpeza do suporte da lâmina de fluxo
Luvas descartáveis, sem pó	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Uso geral
Lenço de papel de laboratório, poucos fiapos	VWR, nº do catálogo 21905-026*	Limpeza da plataforma da lâmina de fluxo e a vedação que cobre o reservatório de amostras de carregamento
Lenço de papel para lentes, 4 x 6 pol.	VWR, nº do catálogo 52846-001*	Limpeza da lâmina de fluxo
Tubos de microcentrífuga	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Desnaturação e diluição de bibliotecas de amostras e DNA de controle de PhiX
Hipoclorito de sódio	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Limpeza do instrumento
Tween 20	Sigma-Aldrich, nº do catálogo P7949	Limpeza do instrumento
Pinças, plásticas com ponta quadrada (opcional)	McMaster-Carr, nº do catálogo 7003A22*	Remoção da lâmina de fluxo do recipiente de transporte da lâmina de fluxo
Água, sem nuclease	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Limpeza do instrumento

* ou equivalente

Orientações para água sem nuclease

Utilize sempre água sem nuclease para realizar os procedimentos com instrumentos. Nunca use água da torneira ou água desionizada. Qualquer um dos exemplos a seguir são aceitáveis:

- Illumina PW1
- Água de 18 Megohm (MΩ)
- Água Milli-Q
- Água Super-Q
- Água de qualidade de biologia molecular

MiSeq FGx Software

Capítulo 2

Introdução 10
MiSeq FGx Control Software 11
Opções do software de análise para execuções RUO 35

Introdução

O software descrito neste capítulo é usado para configurar, executar e analisar dados do MiSeq FGx.

- **MiSeq FGx Control Software**: controla a operação do instrumento, incluindo diversas definições de configuração. Esse software está instalado e funciona no instrumento. Consulte *MiSeq FGx Control Software* na página 11.
- **Real-Time Analysis (RTA)**: executa processamento de imagem e chamada de base, e atribui uma pontuação de qualidade a cada base para cada ciclo. As imagens são armazenadas temporariamente na pasta da execução para processamento pelo RTA e depois automaticamente excluídas quando a análise do RTA é concluída. Esse software está instalado e funciona no instrumento.
- **ForenSeq Universal Analysis Software**: executa a autenticação do usuário e uma análise, por exemplo, demultiplexação, alinhamento, chamada variante e geração de relatório. As funções específicas suportadas variam de acordo com o aplicativo. Esse software é instalado fora do instrumento em um servidor autônomo. A saída pode ser visualizada em um navegador da web. Consulte o *Guia do ForenSeq Universal Analysis Software (nº da peça 15053876)* para obter informações sobre como analisar dados.
- Para execuções RUO, o BaseSpace e o MiSeq Reporter estão disponíveis para executar outras análises. Consulte *Opções do software de análise para execuções RUO* na página 35.

MiSeq FGx Control Software

Durante a execução, o MiSeq FGx Control Software opera a plataforma da lâmina de fluxo, dispensa os reagentes, controla as temperaturas da lâmina de fluxo e captura as imagens de agrupamentos na lâmina de fluxo. O software de controle realiza a execução de acordo com os parâmetros especificados no ForenSeq Universal Analysis Software.

Tela Welcome (Boas-vindas)

A interface do MiSeq FGx Control Software abre a tela Welcome (Boas-vindas) quando o software é iniciado.

Figura 3 Tela Welcome (Boas-vindas)

- **Sequence (Sequência)**: essa opção abre uma série de telas que orientam os usuários pelas etapas de configuração de execução. Consulte *Telas Run Setup (Configuração da execução)* na página 21.
- **Perform Wash (Realizar limpeza)**: fornece opções para iniciar os seguintes tipos de limpezas do instrumento: uma limpeza de manutenção, uma limpeza de espera ou uma limpeza pós-execução. Consulte *Tela Perform Wash (Realizar limpeza)* na página 13.
- **Manage Files (Gerenciar arquivos)**: oferece controles para mover, excluir e fazer upload de arquivos no computador do instrumento. Consulte *Tela Manage Files (Gerenciar arquivos)* na página 14.
- **Run Options (Opções de execução)**: fornece opções para a limpeza pós-execução, a alteração da localização padrão de pastas de dados e a especificação de preferências de notificação por e-mail. Consulte *Tela Run Options (Opções de execução)* na página 16.
- **Manage Instrument (Gerenciar instrumento)**: fornece opções para ir para as configurações do sistema, executar uma verificação no sistema, atualizar manualmente o software, reiniciar ou desligar o instrumento. Consulte *Tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento)* na página 19.

Indicadores de atividade

Vários ícones estão localizados no canto inferior direito de cada tela da interface. Cada ícone é um indicador de atividade que mostra qual atividade está sendo executada pelo instrumento.

Figura 4 Indicadores de atividade

Da esquerda para a direita, os indicadores de atividade representam as seguintes atividades:

- Movimentação do estágio Y
- Movimentação do estágio Z
- Ativação da funcionalidade eletrônica
- Uso da câmera
- Bombeamento através do sistema de fluxo de reagentes

Indicadores de sensor

Quatro indicadores de sensor na base de cada tela de interface representam o status de um componente do instrumento.

Figura 5 Indicadores de sensor

Da esquerda para a direita, os indicadores de sensor representam os seguintes componentes:

- Porta do compartimento da lâmina de fluxo na posição aberta ou fechada
- Temperatura do refrigerador do reagentes em °C
- Temperatura da lâmina de fluxo em °C
- Status da conexão com o servidor

Ícones de status

No canto superior direito da tela Welcome (Boas-vindas), há um ícone de status que indica todas as mudanças nas condições durante a configuração da execução ou durante a execução.

Ícone de status	Nome do status	Descrição
	Status OK	Nenhuma mudança. O sistema está normal.
	Atenção	Informação importante. Uma ação é recomendada.
	Advertência	As advertências não interrompem uma execução, mas podem exigir uma ação antes de prosseguir.
	Erro	Erros geralmente interrompem uma execução e normalmente exigem uma ação antes de prosseguir com a execução.

Quando ocorre uma alteração na condição, o ícone muda para a imagem associada e pisca para alertar. Neste caso, selecione o ícone para abrir a janela de status, que contém uma descrição geral da condição.

- Selecione qualquer item listado para ver uma descrição detalhada da condição e instruções para resolver a condição, se for o caso.
- Selecione **Acknowledge (Confirmar)** para aceitar a mensagem e **Close (Fechar)** para fechar a caixa de diálogo.

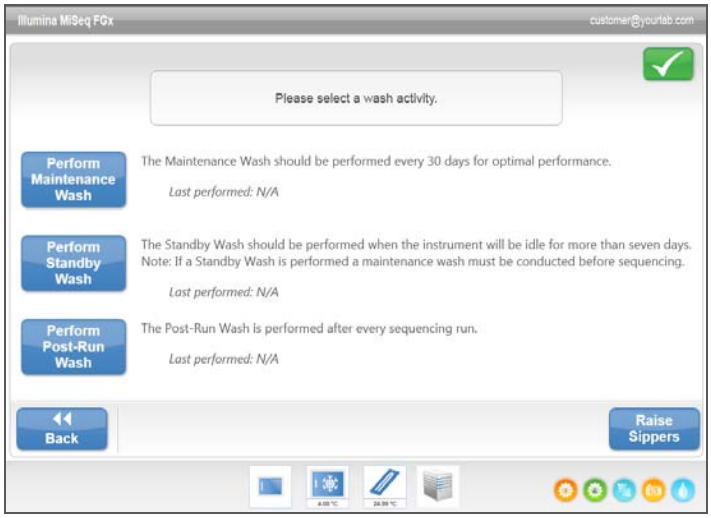
As mensagens na janela de status podem ser filtradas; basta selecionar os ícones ao longo da margem superior da janela. A seleção de um ícone alterna a condição para exibir ou ocultar.

Tela Perform Wash (Realizar limpeza)

A tela Perform Wash (Realizar limpeza) permite que os usuários realizem os seguintes tipos de limpeza, além de ver a data da limpeza executada mais recentemente:

- **Limpeza de manutenção**: a limpeza de manutenção consiste em três ciclos de limpeza consecutivos que limpam o sistema minuciosamente. Realize uma limpeza de manutenção pelo menos a cada 30 dias. Consulte *Procedimento* na página 58.
- **Limpeza para standby**: a limpeza para standby prepara as linhas de fluxo de reagentes de maneira adequada para que fiquem ociosas e consiste em duas limpezas consecutivas. Realize uma limpeza de espera se o instrumento ficar ocioso por até sete dias. Consulte *Realização de uma limpeza de espera* na página 61.
  Depois de colocar o instrumento em um estado ocioso, uma limpeza de manutenção deverá ser executada antes do início de uma execução de sequenciamento.
- **Limpeza pós-execução**: a limpeza pós-execução é a limpeza padrão no instrumento realizada entre as execuções de sequenciamento e consiste em um ciclo de limpeza. Para executar uma limpeza pós-execução em um momento que não seja diretamente após uma execução, use o comando na tela Perform Wash (Realizar limpeza) para iniciar a limpeza.
  O MiSeq FGx pode ser configurado para efetuar uma limpeza de manutenção entre duas execuções, em vez de uma limpeza pós-execução. Para mais informações, consulte *Tela Run Options (Opções de execução)* na página 16.

Figura 6 Tela Perform Wash (Realizar limpeza)


Illumina MiSeq FGx
customer@yourlab.com
Please select a wash activity.
Perform Maintenance Wash
The Maintenance Wash should be performed every 30 days for optimal performance.
Last performed: N/A
Perform Standby Wash
The Standby Wash should be performed when the instrument will be idle for more than seven days.
Note: If a Standby Wash is performed a maintenance wash must be conducted before sequencing.
Last performed: N/A
Perform Post-Run Wash
The Post-Run Wash is performed after every sequencing run.
Last performed: N/A
Back
Raise Sippers

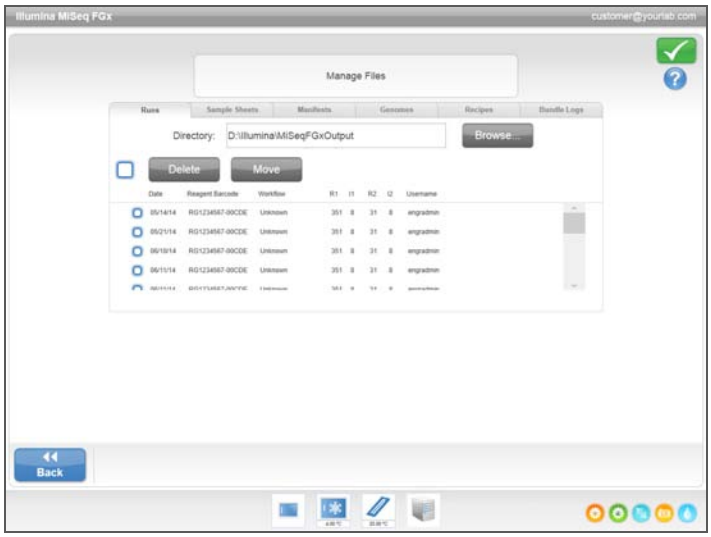
A tela Perform Wash (Realizar limpeza) também inclui um comando que ergue os aspiradores de líquidos, então o cartucho de reagentes pode ser removido do instrumento em caso de erro ou de uma interrupção inesperada na execução.

CUIDADO
Feche sempre a porta do refrigerador de reagentes após carregar a bandeja de limpeza e antes de começar a limpeza. Isso previne possíveis lesões que podem ocorrer se suas mãos estiverem no caminho dos aspiradores quando eles abaixarem.

Tela Manage Files (Gerenciar arquivos)

Use o recurso Manage Files (Gerenciar arquivos) para mover, carregar ou apagar arquivos do computador do instrumento. A tela é dividida em seis guias: Runs (Execuções), Sample Sheets (Planilhas de amostras), Manifests (Manifestos), Genomes (Genomas), Recipes (Receitas) e Bundle Logs (Agrupar logs).

Figura 7 Tela Manage Files (Gerenciar arquivos)



Opções de Manage Files (Gerenciar arquivos)

Em qualquer guia da tela Manage Files (Gerenciar arquivos), selecione **Browse (Procurar)** para ir para os arquivos acessíveis ao instrumento.

Guia	Recursos	Utilização
Runs (Execuções)	Delete (Excluir) ou Move (Mover)	Para o modo forense ou RUO.
Sample Sheets (Planilhas de amostras)	Delete (Excluir), Upload (Carregar) ou Rename (Renomear)	Para o modo RUO.
Manifests (Manifestos)	Delete (Excluir) ou Upload (Carregar)	Para o modo RUO.
Genomes (Genomas)	Delete (Excluir) ou Upload (Carregar)	Para o modo RUO.
Recipes (Receitas)	Delete (Excluir) ou Upload (Carregar)	Para o modo RUO.
Bundle logs (Agrupar logs)	Bundle Logs (Agrupar logs)	Somente para solução de problemas do Suporte técnico da Illumina.

* Os arquivos de manifesto, genoma e receita do ForenSeq são pré-carregados para kits forenses e não devem ser alterados.

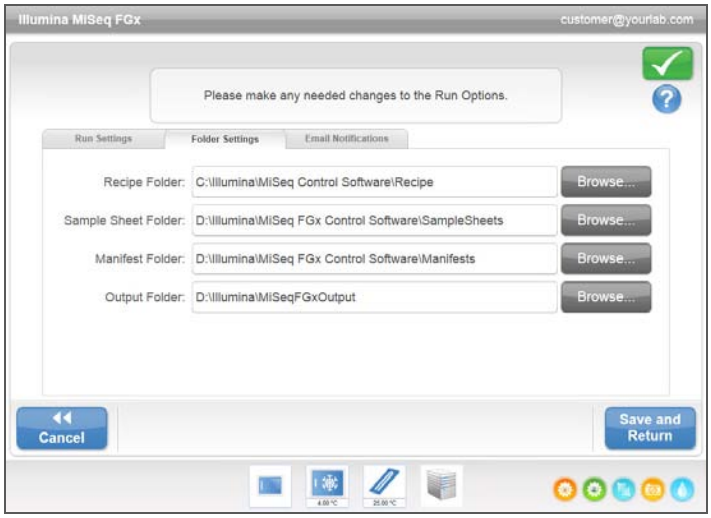
- **Delete (Excluir)**: selecione a caixa de seleção ao lado do arquivo ou da pasta listados e selecione **Delete (Excluir)**. O recurso Delete (Excluir) está disponível em todas as guias. O nível de acesso de usuário de administrador é necessário para excluir arquivos de execução.
- **Move (Mover)**: disponível apenas para pastas de execução. Marque a caixa de seleção ao lado do nome da pasta, selecione **Move (Mover)** e vá até um local apropriado. A opção **Move (Mover)** *copiará* a pasta de execução para o novo local; em seguida, *excluirá* a pasta do local anterior.
- **Select All Files (Selecionar todos os arquivos)**: marque a caixa de seleção à esquerda do botão Delete (Excluir) e selecione uma ação: Delete (Excluir) ou Move (Mover). A ação é aplicada a todos os arquivos ou pastas.
- **Upload Files (Carregar arquivos)**: se o MiSeq FGx não estiver conectado a uma rede, use este recurso para carregar os arquivos da planilha de amostras ou manifestos no computador do instrumento a partir de uma unidade USB. Selecione **Upload (Carregar)** e vá até o local em que a planilha de amostras está, dentro de uma unidade USB. O arquivo é carregado para a pasta indicada no campo Directory (Diretório).
- **Rename (Renomear)**: marque a caixa de seleção ao lado do arquivo de planilha de amostras e selecione **Rename (Renomear)**. Use o teclado da tela para renomear a planilha de amostras.
- **Bundle Logs (Agrupar logs)**: esse comando combina e compacta grupos de arquivos para uso pelo suporte técnico da Illumina para fins de solução de problemas.

.

Tela Run Options (Opções de execução)

A tela Run Options (Opções de execução) tem três guias para especificar as configurações padrão para uma execução: Run Settings (Configurações da execução), Folder Settings (Configurações de pasta) e Email Notifications (Notificações por e-mail).

Figura 8 Guia Run Settings (Configurações de execução) da tela Run Options (Opções de execução)



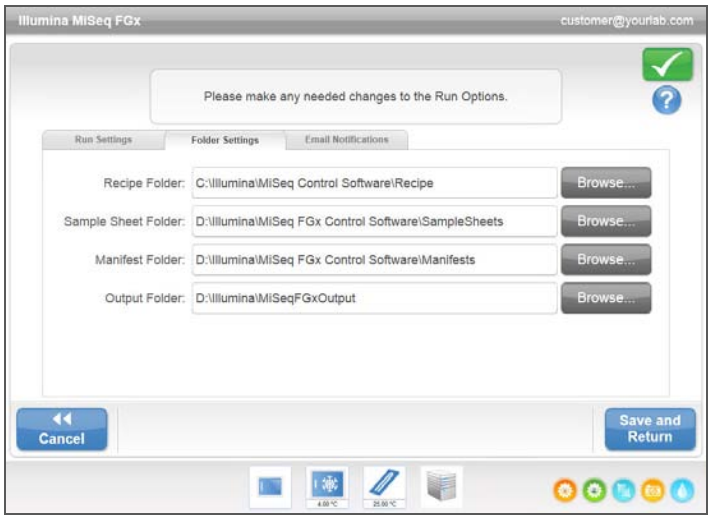
Guia Run Settings (Configurações de execução)

- **Opção Post-Run Wash (Limpeza pós-execução)**: é necessária uma limpeza no instrumento após cada execução. Em uma próxima execução, o programa não prosseguirá para as etapas de configuração de execução até que uma limpeza seja executada. Essa configuração determina o tipo de limpeza que será executada por padrão depois que uma execução for configurada aqui. Uma limpeza pós-execução leva cerca de 30 minutos, e uma limpeza de manutenção leva cerca de 1 hora.

Guia Folder Settings (Configurações de pasta)

O MiSeq FGx requer acesso a vários tipos de arquivos armazenados em pastas em uma rede local ou no computador do instrumento. As opções da guia Folder Settings (Configurações de pasta) dizem ao MiSeq FGx onde essas pastas estão localizadas.

Figura 9 Guia Folder Settings (Configurações de pasta)



- **Recipes (Receitas)**: receitas personalizadas não são suportadas para kits ForenSeq.
- **Sample Sheets (Planilhas de amostras)**: define o local padrão para as informações de amostras no ForenSeq Universal Analysis Software. As informações de amostras são criadas antes da preparação da biblioteca e contêm os parâmetros para a execução.
- **Manifests (Manifestos)**: kits ForenSeq usam arquivos de manifesto pré-carregados.
- **MiSeqFGxOutput**: define o local padrão dos arquivos de saída da análise. A Illumina recomenda a pasta de saída padrão para um local de rede para compartilhamento e armazenamento a longo prazo.

Guia Email Notifications (Notificações por e-mail)

O MiSeq FGx pode ser configurado para enviar um e-mail de notificação quando a análise RTA for concluída, quando a análise ForenSeq Universal Analysis Software for concluída ou se ocorrer um erro de software crítico no MiSeq FGx. A notificação por e-mail fica disponível apenas se o instrumento estiver conectado a uma rede com acesso à Internet.

Figura 10 Guia Email Notifications (Notificações por e-mail)

- **Local SMTP email server address (Endereço de servidor de e-mail SMTP local)**: use o teclado da tela para digitar o endereço de servidor de e-mail SMTP local. Se necessário, entre em contato com o administrador da instalação para obter essa informação.
- **Sender email address (Endereço de e-mail do remetente)**: use o teclado da tela para digitar o endereço de e-mail do remetente. Esse endereço pode ser o endereço de e-mail de um usuário Admin ou um endereço diferente especificado para o envio de notificações por e-mail. O endereço de e-mail do remetente deve ter o mesmo nome de domínio que o endereço do servidor de e-mail.
- **Recipient addresses (Endereços de destinatário)**: use o teclado na tela para digitar os endereços de e-mail de cada destinatário a fim de receber notificações. Separe cada endereço de e-mail com uma vírgula. Selecione **Test (Teste)** para enviar um e-mail de teste aos destinatários das notificações.
- **Notify via email when (Notificar por e-mail quando)**: marque a caixa de seleção para os eventos da execução que vão gerar uma notificação.

Tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento)

A tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento) contém controles para as configurações do sistema, solução de problemas, atualizações manuais do software, reinício ou encerramento do software do instrumento.

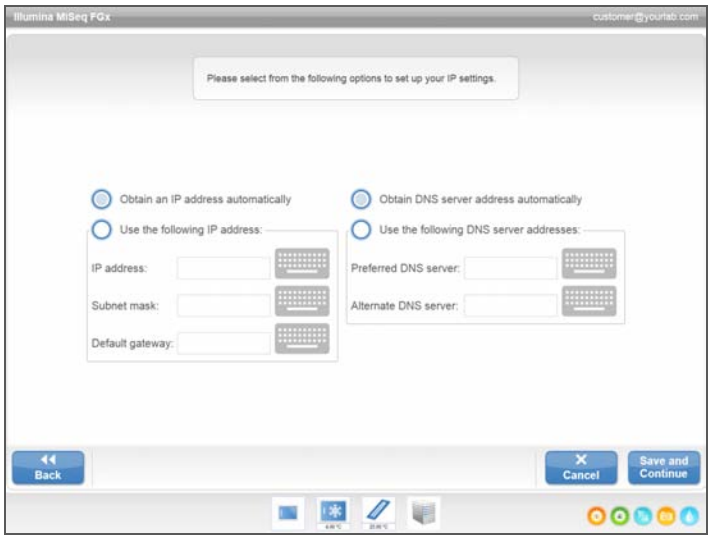
Figura 11 Tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento)

- **System Settings (Configurações do sistema)**: fornece a opção para alterar as configurações IP, o nome da máquina ou o domínio. Consulte *Tela System Settings (Configurações do sistema)* na página 20.
- **System Check (Verificação do sistema)**: fornece opções de solução de problemas para verificar o status operacional de componentes do instrumento. Consulte *Tela System Check (Verificação do sistema)* na página 20.
- **Manual Update (Atualização manual)**: fornece a opção para atualizar o software de forma manual no computador do instrumento. Consulte *Tela Manual Update (Atualização manual)* na página 21.
- **Reboot (Reiniciar)**: use o comando Reboot para reiniciar o software do sistema. Não há nenhuma exigência para reiniciar o software como parte da manutenção regular.
- **Shut Down (Encerrar)**: use o comando Shut Down (Encerrar) para encerrar o software de controle e o Windows no computador do instrumento. Consulte *Desligamento do instrumento* na página 63.
- **Minimize to Windows (Minimizar para Windows)**: fornece acesso rápido ao sistema operacional do instrumento e a quaisquer pastas localizadas no computador do instrumento quando o MiSeq FGx estiver sendo executado no modo de quiosque, oposto ao modo Windows.
  É necessário ter nível de acesso de usuário Admin ou SuperUser para utilizar este recurso.

Tela System Settings (Configurações do sistema)

As configurações do sistema normalmente são definidas quando o instrumento é instalado e iniciado pela primeira vez. Se alguma configuração precisar ser alterada por causa de uma mudança de rede ou instalação, use o recurso System Settings (Configurações do sistema).

Figura 12 Configurações do sistema



Entre em contato com o administrador da instalação para obter informações sobre as configurações de rede.

Tela System Check (Verificação do sistema)

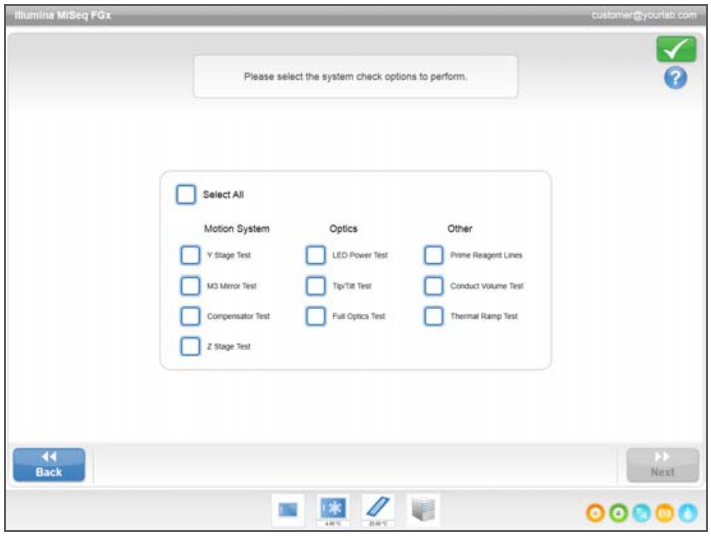
A tela System Check (Verificação do sistema) é normalmente usada para se conectar com um representante do suporte técnico da Illumina durante uma sessão Live Help (Ajuda ao vivo). O uso desse recurso não é necessário durante a operação normal ou para a manutenção do instrumento.

Algumas verificações do sistema podem ser realizadas antes de entrar em contato com o suporte técnico da Illumina, como o teste de volume. Um teste de volume verifica a integridade do sistema de fluxo de reagentes estimando o volume do fluxo enquanto as bolhas passam pelos sensores. Para obter mais informações, consulte *Realização de um teste de volume* na página 72.

Após a conclusão de uma verificação do sistema, os resultados do teste aparecem na tela:

- Selecione **Show Details (Mostrar detalhes)** para ver um resumo dos resultados na interface do programa.
- Selecione **Export Results (Exportar resultados)** para exportar os resultados em formato *.csv para uma unidade USB.

Figura 13 Opções de System Check (Verificação do sistema)



Tela Manual Update (Atualização manual)

O recurso Manual Update (Atualização manual) é usado para atualizar o software de controle do instrumento e o software de análise. Esse recurso não está disponível para o MiSeq FGx. Todas as atualizações de software são executadas pela equipe do Illumina para manter a configuração adequada do sistema.

Tela Review (Revisão)

A tela Review (Revisão) confirma que o MiSeq FGx Control Software recebeu informações de execução do ForenSeq Universal Analysis Software.

Figura 14 Tela Review (Revisão)

Telas Run Setup (Configuração da execução)

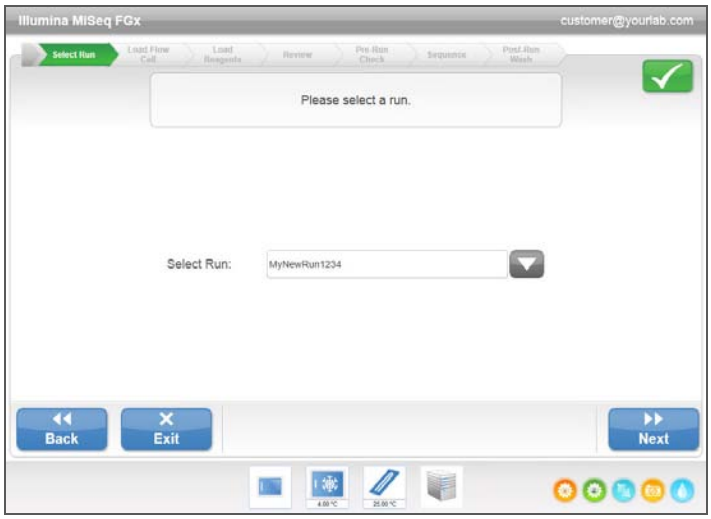
Após a seleção da **Sequence (Sequência)** na tela Welcome (Boas-vindas), selecione um tipo de execução. Quando você seleciona Forensic Genomics (Genômica forense), uma série de telas para configuração da execução é exibida na seguinte ordem: Select Run (Selecionar execução), Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo), Load Reagents (Carregar reagentes),

Review (Revisão) e Pre-Run Check (Verificação pré-execução). Quando você seleciona uma Research Use Only Run (Execução somente pesquisa), uma série diferente de telas de configuração de execução é exibida. Consulte *Telas de configuração da execução para uma execução RUO* na página 25.

Tela Select A Run (Selecionar uma execução)

Selecione uma execução para sequenciamento usando o menu suspenso. As execuções são configuradas no ForenSeq Universal Analysis Software.

Figura 15 Tela Select a Run (Selecionar uma execução)



Tela Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo)

A tela Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo) aparece quando é hora de carregar a lâmina de fluxo). Após o carregamento da lâmina de fluxo, feche a trava da lâmina de fluxo e a porta do compartimento da lâmina de fluxo. A trava e a porta do compartimento devem ser fechadas antes de a execução ser iniciada.

Figura 16 Tela Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo)

Quando a lâmina de fluxo estiver carregada, o programa lerá e gravará o RFID. Uma confirmação de que o RFID foi lido com sucesso aparecerá no canto inferior direito da tela.

No caso do RFID não poder ser lido, as informações de identificação podem ser introduzidas manualmente. No entanto, o software permite que apenas um dos três componentes marcados como RFID (célula de fluxo, cartucho de reagentes, Solução SBS

(PR2)) falhe em uma execução. Para obter mais informações, consulte *Resolução da falha de leitura do RFID* na página 68.

Selecione o ícone de ajuda no canto superior direito da tela. O arquivo de ajuda contém um vídeo que ilustra as etapas para o carregamento da lâmina de fluxo.

Tela Load Reagents (Carregar reagentes)

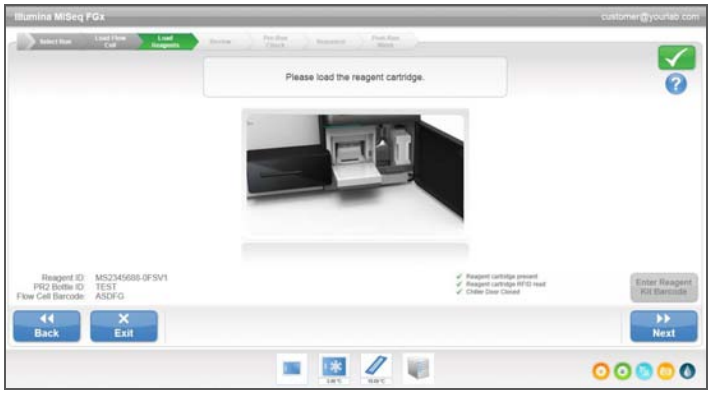
A tela Load Reagents (Carregar reagentes) tem duas etapas: primeiro, carregue o frasco de Solução SBS (PR2) e o frasco de resíduos vazio e, em seguida, carregue o cartucho de reagentes. Depois de o frasco de Solução SBS (PR2) e o cartucho de reagentes terem sido carregados, o software lê e grava o RFID. Uma confirmação de que o RFID foi lido com sucesso aparecerá no canto inferior direito da tela.

OBSERVAÇÃO

Use os componentes corretos do kit de reagentes (sequenciamento) para o tipo de execução realizada. As execuções genômicas forenses funcionam apenas com os kits de sequenciamento ForenSeq, e as execuções RUO funcionam apenas com os kits de reagente RUO.

Figura 17 Carregamento do frasco de Solução SBS (PR2) e do frasco de resíduos

Figura 18 Carregamento do cartucho de reagentes



No caso do RFID não poder ser lido, as informações de identificação podem ser introduzidas manualmente. No entanto, o software permite que apenas um dos três componentes marcados como RFID (célula de fluxo, cartucho de reagentes, Solução SBS (PR2)) falhe em uma execução forense. Para obter mais informações, consulte *Resolução da falha de leitura do RFID* na página 68.

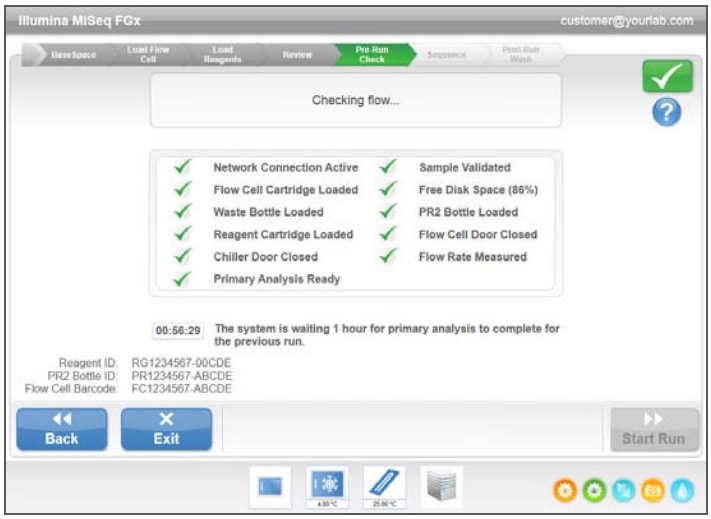
Selecione o ícone de ajuda no canto superior direito da tela. O arquivo de ajuda contém um vídeo que ilustra as etapas para o carregamento do cartucho de reagentes e do frasco de Solução SBS (PR2).

Tela Pre-Run Check (Verificação pré-execução)

O programa executa automaticamente uma verificação pré-execução dos componentes e das condições de execução necessários antes de permitir o início da execução. Se algum erro ocorrer durante a verificação pré-execução, uma mensagem aparecerá na tela descrevendo o erro e a ação para corrigi-la.

Para obter mais informações, consulte *Resolução dos erros de configuração da execução* na página 67.

Figura 19 Tela Pre-Run Check (Verificação pré-execução)



Quando a verificação pré-execução for bem-sucedida, o botão **Start Run (Iniciar execução)** ficará ativo.

Tela Sequencing (Sequenciamento)

A tela Sequencing (Sequenciamento) é aberta no início da execução. Esta tela oferece uma representação visual da execução em andamento, incluindo intensidades e pontuações de qualidade (Q-scores).

- **Run Progress (Andamento da execução)**: mostra o andamento da execução em uma barra de status e lista o número de ciclos concluídos.
- **Intensity (Intensidade)**: mostra o valor das intensidades de clusters do 90º percentil para cada bloco.
  O gráfico na área de intensidade representa o número de blocos e o número de superfícies cujas imagens estão sendo criadas:
  - A lâmina de fluxo aparece apenas na superfície superior. Um gráfico com uma única coluna é exibido.
- **Flow Cell (Lâmina de fluxo)**: mostra a temperatura atual da lâmina de fluxo indicada por cor. Azul indica temperaturas mais baixas, enquanto laranja e vermelho indicam temperaturas mais altas. Durante a geração de imagens, os blocos com imagens geradas aparecem em cinza escuro. Durante a química, linhas onduladas indicam que os reagentes estão sendo bombeados através da lâmina de fluxo.
- **Cluster Density (Densidade de clusters) (K/mm²)**: mostra o número de clusters por milímetro quadrado para a execução. O ideal é esperar uma densidade de cluster de 400-1.650 K/mm².

- **Clusters Passing Filter (Clusters que passam o filtro) (%)**: mostra a porcentagem de clusters que passam o filtro com base no filtro de pureza da Illumina, que mede a qualidade. Estes dados aparecem somente após o ciclo 25.

  OBSERVAÇÃO
  A pureza de uma chamada de base é a relação entre a intensidade do maior sinal dividido pela soma dos dois maiores sinais. Se houver mais de uma chamada de base com pureza inferior a 0,6 nos primeiros 25 ciclos, as leituras não passarão no filtro de qualidade

- **Phasing (%)**: consulte *Número de ciclos em uma leitura* na página 32 e a seção da guia Run Metrics (Métricas da execução) no *Guia do ForenSeq Universal Analysis Software (nº da peça 15053876)*.
- **Prephasing (%)**: consulte *Número de ciclos em uma leitura* na página 32 e a seção da guia Run Metrics (Métricas da execução) no *Guia do ForenSeq Universal Analysis Software (nº da peça 15053876)*.
- **Read 1 (Leitura 1)**: para obter informações, consulte a seção da guia Run Metrics (Métricas da execução) no *Guia do ForenSeq Universal Analysis Software (nº da peça 15053876)*.
- **Index 1 (Índice 1)**: para obter informações, consulte a seção da guia Run Metrics (Métricas da execução) no *Guia do ForenSeq Universal Analysis Software (nº da peça 15053876)*.
- **Read 2 (Leitura 2)**: para obter informações, consulte a seção da guia Run Metrics (Métricas da execução) no *Guia do ForenSeq Universal Analysis Software (nº da peça 15053876)*.
- **Index 2 (Índice 2)**: para obter informações, consulte a seção da guia Run Metrics (Métricas da execução) no *Guia do ForenSeq Universal Analysis Software (nº da peça 15053876)*.

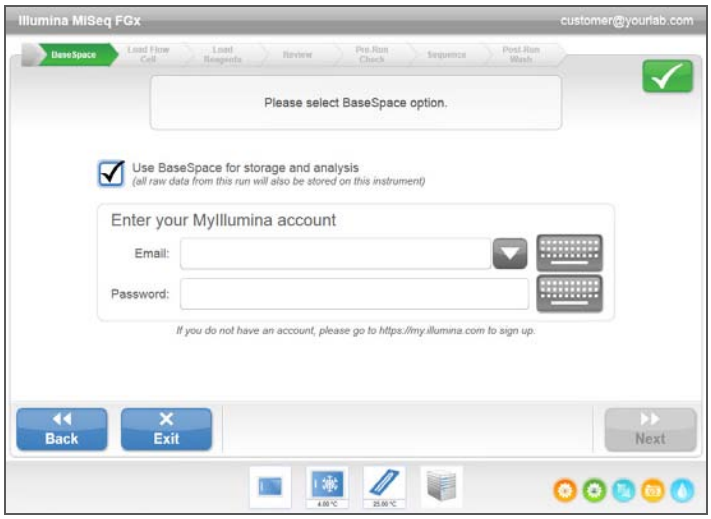
Telas de configuração da execução para uma execução RUO

Após a seleção da **Sequence (Sequência)** na tela Welcome (Boas-vindas), selecione um tipo de execução. Quando você seleciona Research Use Only Run (Execução somente pesquisa), uma série de telas para configuração da execução é exibida na seguinte ordem: BaseSpace Option (Opção do BaseSpace), Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo), Load Reagents (Carregar reagentes), Review (Revisão) e Pre-Run Check (Verificação pré-execução). Quando você seleciona Forensic Genomics (Genômica forense), uma série diferente de telas de configuração da execução é exibida. Consulte *Telas Run Setup (Configuração da execução)* na página 21.

Tela BaseSpace Options (Opções do BaseSpace)

Se você estiver realizando uma análise de uma execução RUO no BaseSpace, selecione **Use BaseSpace for storage analysis (Usar o BaseSpace para análise de armazenamento)**. Quando você seleciona a opção BaseSpace, as informações sobre a execução são transferidas para o BaseSpace. Digite as informações sobre sua conta MyIllumina.

Figura 20 Tela BaseSpace Options (Opções do BaseSpace)


Illumina MiSeq FGx
customer@yourlab.com
Please select BaseSpace option.
Use BaseSpace for storage and analysis
(all raw data from this run will also be stored on this instrument)
Enter your MyIllumina account
Email:
Password:
If you do not have an account, please go to https://my.illumina.com to sign up.
Back
Exit
Next

Tela Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo)

A tela Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo) aparece quando é hora de carregar a lâmina de fluxo). Após o carregamento da lâmina de fluxo, feche a trava da lâmina de fluxo e a porta do compartimento da lâmina de fluxo. A trava e a porta do compartimento devem ser fechadas antes de a execução ser iniciada.

Figura 21 Tela Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo)

Quando a lâmina de fluxo estiver carregada, o programa lerá e gravará o RFID. Uma confirmação de que o RFID foi lido com sucesso aparecerá no canto inferior direito da tela.

No caso do RFID não poder ser lido, as informações de identificação podem ser introduzidas manualmente. No entanto, o software permite que apenas um dos três componentes marcados como RFID (célula de fluxo, cartucho de reagentes, Solução SBS (PR2)) falhe em uma execução. Para obter mais informações, consulte *Resolução da falha de leitura do RFID* na página 68.

Selecione o ícone de ajuda no canto superior direito da tela. O arquivo de ajuda contém um vídeo que ilustra as etapas para o carregamento da lâmina de fluxo.

Tela Load Reagents (Carregar reagentes)

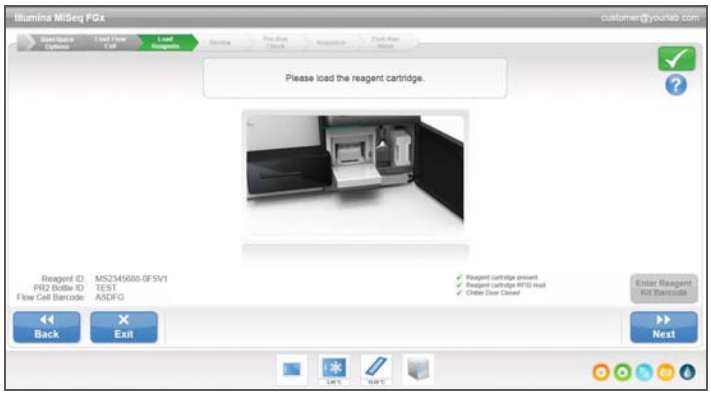
A tela Load Reagents (Carregar reagentes) tem duas etapas: primeiro, carregue o frasco de Solução SBS (PR2) e o frasco de resíduos vazio e, em seguida, carregue o cartucho de reagentes. Depois de o frasco de Solução SBS (PR2) e o cartucho de reagentes terem sido carregados, o software lê e grava o RFID. Uma confirmação de que o RFID foi lido com sucesso aparecerá no canto inferior direito da tela.

OBSERVAÇÃO

Use os componentes corretos do kit de reagentes (sequenciamento) para o tipo de execução realizada. As execuções genômicas forenses funcionam apenas com os kits de sequenciamento ForenSeq, e as execuções RUO funcionam apenas com os kits de reagente RUO.

Figura 22 Carregamento do frasco de Solução SBS (PR2) e do frasco de resíduos

Figura 23 Carregamento do cartucho de reagentes



No caso do RFID não poder ser lido, as informações de identificação podem ser introduzidas manualmente. No entanto, o software permite que apenas um dos três componentes marcados como RFID (célula de fluxo, cartucho de reagentes, Solução SBS (PR2)) falhe em uma execução forense. Para obter mais informações, consulte *Resolução da falha de leitura do RFID* na página 68.

Selecione o ícone de ajuda no canto superior direito da tela. O arquivo de ajuda contém um vídeo que ilustra as etapas para o carregamento do cartucho de reagentes e do frasco de Solução SBS (PR2).

Alteração da planilha de amostra

É necessário ter uma planilha de amostra para uma execução RUO. Por padrão, o programa procura por um arquivo de planilha de amostra com um nome que corresponda ao número do código de barras do cartucho de reagentes carregado no instrumento. Se nenhuma planilha de amostra for encontrada, uma janela será exibida para que você possa navegar até a planilha de amostra.

Selecione o botão **Change Sample Sheet (Alterar planilha de amostra)** na tela Load Reagents (Carregar reagentes) e vá até a planilha de amostra apropriada.

Tela Review (Revisão)

A tela Review (Revisão) confirma que o programa localizou a planilha de amostras para a execução e lista o nome da planilha de amostra e os parâmetros fornecidos na planilha de amostras.

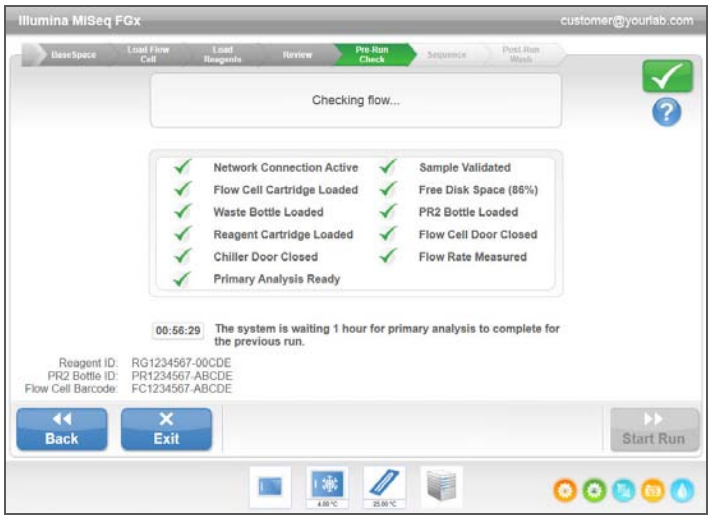
Figura 24 Tela Review (Revisão)

Tela Pre-Run Check (Verificação pré-execução)

O programa executa automaticamente uma verificação pré-execução dos componentes e das condições de execução necessários antes de permitir o início da execução. Se algum erro ocorrer durante a verificação pré-execução, uma mensagem aparecerá na tela descrevendo o erro e a ação para corrigi-la.

Para obter mais informações, consulte *Resolução dos erros de configuração da execução* na página 67.

Figura 25 Tela Pre-Run Check (Verificação pré-execução)



Quando a verificação pré-execução for bem-sucedida, o botão **Start Run (Iniciar execução)** ficará ativo.

Tela Sequencing (Sequenciamento) para RUO

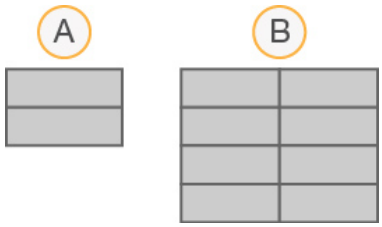
1 Durante a execução RUO, monitore o progresso, as intensidades e as pontuações de qualidade da execução na tela Sequencing (Sequenciamento). A tela Sequencing (Sequenciamento) é somente para exibição.

Para monitorar a execução com mais detalhes, use o Sequencing Analysis Viewer (SAV) instalado em outro computador independente do computador do instrumento. É necessária uma conexão de rede. Consulte *Guia de usuário do Sequencing Analysis Viewer (nº da peça 15020619)*.

Como alternativa, se você estiver conectado ao BaseSpace, poderá monitorar a execução usando o SAV no BaseSpace.

- **Run Progress (Andamento da execução)**: mostra o andamento da execução em uma barra de status e lista o número de ciclos concluídos.
- **Intensity (Intensidade)**: mostra o valor das intensidades de clusters do 90º percentil para cada bloco.

  O gráfico na área de intensidade representa o número de blocos e o número de superfícies cujas imagens estão sendo criadas:
  - Se a imagem da lâmina de fluxo for criada somente na superfície superior, um gráfico com uma coluna será exibido.
  - Se a imagem da lâmina de fluxo for criada nas superfícies superior e inferior, um gráfico com duas colunas será exibido.



A Indica dois blocos, apenas na superfície superior
B Indica quatro blocos, superfícies superior e inferior

- **Q-Score All Cycles (Q-Score de todos os ciclos)**: mostra a porcentagem média de bases superiores a Q30, que é uma medição da pontuação de qualidade (Q-score). Uma Q-score é uma previsão da probabilidade de uma chamada de base errada. As Q-scores são calculadas após o ciclo 25.

Q-Score	Probabilidade da chamada de base errada
Q40	1 em 10.000
Q30	1 em 1.000
Q20	1 em 100
Q10	1 em 10

- **Cluster Density (Densidade de clusters) (K/mm²)**: mostra o número de clusters por milímetro quadrado para a execução.
- **Clusters Passing Filter (Clusters que passam o filtro) (%)**: mostra a porcentagem de clusters que passam o filtro com base no filtro de pureza da Illumina, que mede a qualidade. Estes dados aparecem somente após o ciclo 25.

  OBSERVAÇÃO
  A pureza de uma chamada de base é a relação entre a intensidade do maior sinal dividido pela soma dos dois maiores sinais. Se houver mais de uma chamada de base com pureza inferior a 0,6 nos primeiros 25 ciclos, as leituras não passarão no filtro de qualidade

- **Estimated Yield (Rendimento estimado) (Mb)**: mostra o número projetado de bases chamadas para a execução, medido em megabases. Estes dados aparecem somente após o ciclo 25.

2 Quando a execução for concluída, o botão Next (Próximo) aparecerá. Revise os resultados na tela Sequencing (Sequenciamento) antes de prosseguir.

  OBSERVAÇÃO
  A pureza de uma chamada de base é a relação entre a intensidade do maior sinal dividido pela soma dos dois maiores sinais. Se houver mais de uma chamada de base com pureza inferior a 0,6 nos primeiros 25 ciclos, as leituras não passarão no filtro de qualidade

3 Selecione **Next (Próximo)** para sair da tela Sequencing (Sequenciamento) e prosseguir para uma limpeza pós-execução.

Figura 26 Tela Sequencing (Sequenciamento) para uma execução RUO

Geração do modelo

A geração de modelo de posições dos clusters é o processo pelo qual as posições dos clusters em toda a superfície da lâmina de fluxo são definidas de acordo com a posição das coordenadas X e Y. Real-Time Analysis (RTA) usa os primeiros sete ciclos da execução de sequenciamento para geração de modelo para o MiSeq FGx e kits RUO v3, e os primeiros quatro ciclos para kits RUO v1 e v2.

Após o modelo das posições dos clusters ser gerado, as imagens produzidas ao longo de cada ciclo subsequente da geração de imagens são alinhadas em comparação com o modelo. As intensidades individuais dos clusters em todos os quatro canais de cor de nucleotídeos extraídos e as chamadas de base são produzidas a partir das intensidades normalizadas dos clusters.

Pastas de execução

Cada execução no MiSeq FGx gera três pastas de execução, cada uma com uma finalidade específica:

- **D:\Illumina\MiSeqFGxTemp**: quando a execução é iniciada, uma pasta temporária de execução é criada no disco local do computador do instrumento e usada como uma área de trabalho para o MiSeq FGx Control Software e o RTA. Não é necessário acessar a pasta Temp. O conteúdo desta pasta é excluído após sete dias.
- **D:\Illumina\MiSeqFGxOutput**: o RTA copia arquivos da pasta Temp (Temporária) para a pasta Output (Saída). Conforme os arquivos de chamada de base e de pontuação de qualidade da chamada de base são gerados, o RTA copia os arquivos de volta para a pasta Temp e preenche a pasta Analysis (Análise). Imagens de foco e imagens em miniatura não são copiadas para a pasta Analysis (Análise).
  A localização da pasta de saída pode ser alterada no campo Output Folder (Pasta de saída) na tela Run Options (Opções de execução). Para obter mais informações, consulte *Tela Run Options (Opções de execução)* na página 16.
- **D:\Illumina\MiSeqFGxAnalysis**: quando a análise RTA é concluída, o ForenSeq Universal Analysis Software acessa a pasta Analysis (Análise) no disco local do instrumento para começar outra análise. Todos os arquivos gravados na pasta Analysis (Análise) são copiados para a pasta Output (Saída). Para obter mais informações, consulte o *Guia do ForenSeq Universal Analysis Software (nº da peça 15053876)*.

Nomenclatura da pasta principal

O nome da pasta principal da execução identifica a data da execução, o número do instrumento e a lâmina de fluxo usada para a execução. Para qualquer execução, cada pasta de execução segue o mesmo formato de nomenclatura.

Por padrão, o nome da pasta usa o seguinte formato:

AAMMDD_<NúmerodoInstrumento>_<Número da execução>_
A<CódigodeBarrasdaLâminadeFluxo>

O número da execução aumenta em um cada vez que uma execução é realizada em um determinado instrumento.

Duração da execução

A duração da execução depende do número de ciclos executados. O MiSeq FGx pode realizar 8 + 8 execuções de sequenciamento do tipo paired-end com 351 x 31 ciclos para kits ForenSeq.

Número de ciclos em uma leitura

O número de ciclos realizados em uma leitura é um ciclo a mais do que o número de ciclos analisados. O ciclo extra é necessário para os cálculos de phasing e prephasing.

Por exemplo, uma execução de 350 + 30 ciclos do tipo paired-end realiza uma leitura de 351 ciclos e uma leitura de 31 ciclos, num total de 382 ciclos. Ao final da execução, 380 ciclos são analisados.

Para obter informações sobre o número de ciclos que podem ser executados com um kit, consulte *Guia de referência do kit de reagentes MiSeq FGx (nº da peça 15055483)*. Se você estiver executando uma execução RUO, consulte o guia de preparação de reagente apropriado do Kit de reagentes MiSeq para RUO.

Espaço em disco necessário

O computador integrado do instrumento tem aproximadamente 550 GB de capacidade de armazenamento.

Antes de iniciar uma execução, o programa verifica o espaço em disco disponível. Se não houver espaço em disco suficiente para a execução, um aviso aparecerá. A mensagem indica quanto espaço em disco é necessário para a execução e quanto espaço em disco deve ser liberado antes que a execução possa prosseguir.

Se você for solicitado a liberar espaço em disco, vá para a tela Welcome (Boas-vindas) e selecione **Manage Files (Gerenciar arquivos)**. Na tela Manage Files (Gerenciar arquivos), selecione a guia **Runs (Execuções)**. Mova ou exclua as pastas de execução mais antigas, conforme o caso. Para mais informações, consulte *Tela Manage Files (Gerenciar arquivos)* na página 14. Depois de liberar o espaço em disco adequado, selecione **Restart Check (Reiniciar verificação)**.

Pausa ou interrupção de uma execução

O MiSeq FGx foi projetado para completar uma execução do início ao fim, sem a intervenção do usuário. No entanto, é possível pausar ou interromper uma execução na tela Sequencing (Sequenciamento).

Pausa na execução

Uma execução pode ser pausada durante o sequenciamento, se for necessário (por exemplo, para esvaziar o frasco de resíduos ou verificar o volume restante no frasco de Solução SBS (PR2)), e retomada logo em seguida, para que o sequenciamento continue.

CUIDADO

Não pause uma execução durante a clusterização nem nos primeiros oito ciclos do sequenciamento. Não é possível retomar uma execução que foi pausada durante essa etapa. Se você usar o MiSeq FGx no modo RUO, consulte *Métricas da execução* na página 52 para ver as informações sobre o ciclo para kits de cartucho de reagentes.

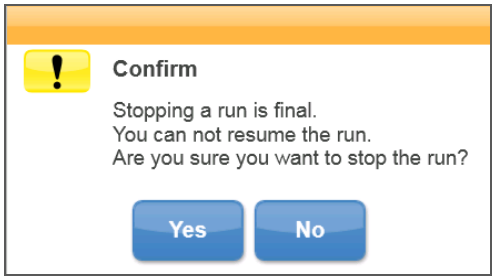
Para pausar uma execução na tela Sequencing (Sequenciamento), selecione **Pause (Pausar)**. O comando atual será concluído, em seguida, a execução será pausada, a lâmina de fluxo será colocada em um estado seguro e o botão mudará para **Resume (Continuar)**. Nesse momento é possível esvaziar o frasco de resíduos, por exemplo. Selecione **Resume (Continuar)** para continuar a execução.

Interrupção de uma execução

Uma execução pode ser interrompida durante o sequenciamento, se for necessário (por exemplo, se a execução tiver sido configurada de forma incorreta, se a qualidade dos dados for ruim, ou se houver um erro de hardware).

Para interromper uma execução na tela Sequencing (Sequenciamento), selecione **Stop (Parar)**. Quando uma execução for interrompida, o comando atual não será concluído e a plataforma da lâmina de fluxo se movimentará para a frente. A análise RTA continuará no último ciclo concluído.

Figura 27 Interrupção de uma execução



A interrupção de uma execução é definitiva. Uma execução interrompida não pode ser retomada. A única opção é seguir para uma limpeza no instrumento.

Se você interromper uma execução, não poderá usar os reagentes restantes no cartucho de reagentes para uma próxima execução. Uma nova execução exige um novo cartucho de reagentes.

Live Help (Ajuda ao vivo)

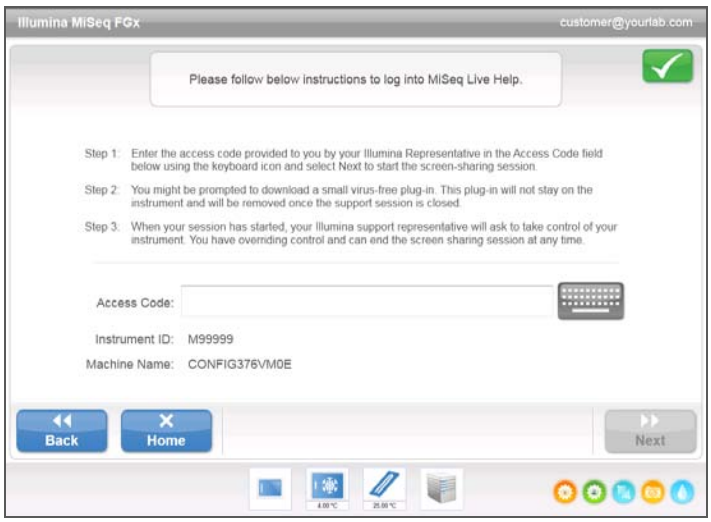
O MiSeq FGx deve estar conectado a uma rede com acesso à Internet para ativar o Live Help. O recurso Live Help é uma ferramenta de assistência on-line que permite que um representante do suporte técnico da Illumina visualize a tela do MiSeq FGx com sua permissão e compartilhe o controle do instrumento. Você tem controle sobre a substituição e pode terminar a sessão de compartilhamento de tela a qualquer momento.

Acesse o Live Help pelo ícone de ajuda na tela Welcome (Boas-vindas).

Figura 28 Menu de ajuda

Para habilitar uma conexão, obtenha um código de acesso exclusivo do suporte técnico da Illumina, digite esse código na tela Live Help (Ajuda ao vivo) e selecione **Next (Próximo)**.

Figura 29 Tela Live Help (Ajuda ao vivo)


Illumina MiSeq FGx
customer@yourlab.com
Please follow below instructions to log into MiSeq Live Help.
Step 1: Enter the access code provided to you by your Illumina Representative in the Access Code field below using the keyboard icon and select Next to start the screen-sharing session.
Step 2: You might be prompted to download a small virus-free plug-in. This plug-in will not stay on the instrument and will be removed once the support session is closed.
Step 3: When your session has started, your Illumina support representative will ask to take control of your instrument. You have overriding control and can end the screen sharing session at any time.
Access Code:
Instrument ID: M99999
Machine Name: CONFIG376VM0E
Back
Home
Next

Opções do software de análise para execuções RUO

Após a conclusão da análise RTA, os dados de sequenciamento do MiSeq FGx para execuções ForenSeq exigem a análise no ForenSeq Universal Analysis Software. Ao realizar uma execução RUO no MiSeq FGx, os dados de sequenciamento podem ser analisados na nuvem usando BaseSpace ou no computador de instrumento, usando MiSeq Reporter. O BaseSpace e o MiSeq Reporter produzem informações sobre o conjunto de elementos contíguos, alinhamento e variantes para cada genoma solicitado e para cada amostra de uma execução com várias amostras.

Visão geral do BaseSpace

O BaseSpace é um ambiente de computação em nuvem da Illumina. Usar o BaseSpace para armazenar e analisar os dados de execução oferece as seguintes vantagens:

- Elimina a necessidade de computação e armazenamento no local
- Permite a análise e o gerenciamento de dados com base na Web
- Permite que uma nova execução de sequenciamento seja iniciada enquanto os dados estão sendo analisados
- Fornece ferramentas para compartilhamento e colaboração global

Quando você começa sua execução de sequenciamento, os arquivos de dados são criptografados durante o processo, descriptografados durante a análise e criptografados novamente ao serem armazenados.

Você pode fazer login no BaseSpace ao configurar a execução de sequenciamento. Para mais informações, consulte *Tela BaseSpace Options (Opções do BaseSpace)* na página 26.

O BaseSpace se desconecta automaticamente do MiSeq FGx ao final da execução ou assim que o upload de todos os arquivos da análise de RTA termina. Se a conexão com a Internet for interrompida, o upload dos arquivos de análise continuará depois que a conexão for restaurada, a partir do ponto em que ocorreu a interrupção.

Assim que o último arquivo de chamada de base for carregado no BaseSpace, a análise adicional dos dados é iniciada. Os mesmos fluxos de trabalho de análise são compatíveis com o BaseSpace, como com a análise no instrumento com o uso do MiSeq Reporter. O BaseSpace suporta apenas os mesmos genomas fornecidos com o MiSeq Reporter.

É possível se conectar ao BaseSpace no site basespace.com. Faça o login usando sua conta MyIllumina. Para obter mais informações sobre como usar o BaseSpace, consulte a ajuda on-line do BaseSpace no site da Illumina: www.illumina.com/help/BaseSpaceHelp/BaseSpaceHelp.htm.

Visão geral do MiSeq Reporter

MiSeq Reporter é um aplicativo de serviço do Windows que processa as chamadas de base geradas pela análise inicial. O MiSeq Reporter inicia uma análise adicional logo após a conclusão da análise de RTA da execução de sequenciamento.

O MiSeq Reporter é executado no computador do instrumento MiSeq FGx. No entanto, a interface do software deve ser exibida por um navegador da Web em outro computador conectado à mesma rede do MiSeq Reporter.

Quando a análise secundária for concluída, um arquivo chamado CompletedJobInfo.xml será gravado na pasta da execução. Para obter mais informações, consulte o *MiSeq Reporter User Guide (Guia do usuário do MiSeq Reporter) (nº da peça 15042295)*.

Sequenciamento durante a análise

Se você escolher MiSeq Reporter para análise adicional de uma execução RUO, os recursos de computação do instrumento MiSeq FGx são dedicados ao sequenciamento ou à análise. Se uma nova execução de sequenciamento for iniciada no MiSeq FGx antes da conclusão de uma análise secundária ou de uma execução anterior, uma caixa de diálogo de confirmação será exibida. Após a confirmação da execução de sequenciamento, a análise secundária é interrompida.

Para reiniciar a análise, use o recurso **Requeue (Recolocar na fila)** na interface do MiSeq Reporter após a conclusão da nova execução de sequenciamento. Nesse ponto, a análise começa desde o início.

Realização de uma execução

Capítulo 3

Introdução 38
MiSeq FGx Fluxo de trabalho 39
Preparação do cartucho de reagentes 41
Login e seleção do tipo de execução 44
Limpeza da lâmina de fluxo 45
Carregamento da lâmina de fluxo 47
Carregamento de reagentes 49
Início da execução 51
Monitoramento da execução 52

Introdução

Para realizar uma execução no MiSeq FGx, execute as etapas de configuração descritas neste capítulo. Após o início da execução, nenhuma intervenção do usuário é necessária.

Após a conclusão da execução de sequenciamento, faça a limpeza do instrumento.

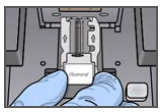
MiSeq FGx Fluxo de trabalho

Certifique-se de que as bibliotecas de amostras já tenham sido carregadas no cartucho de reagentes antes de configurar a execução. Essas etapas se aplicam a qualquer protocolo do ensaio.

Prepare o cartucho de reagentes e carregue a biblioteca agrupada no reservatório designado.

Na interface do programa, selecione **Sequence (Sequenciar)** para iniciar as etapas de configuração da execução.

[Opcional] Conecte-se ao BaseSpace se estiver realizando uma execução RUO.



Limpe e seque cuidadosamente a lâmina de fluxo.

Siga as solicitações de software para carregar a lâmina de fluxo.

Siga as solicitações do software para carregar o frasco Solução SBS (PR2), certifique-se de que o frasco de resíduos esteja vazio e carregue o cartucho de reagentes. Para uma execução RUO, selecione uma planilha de amostra.

Revise os parâmetros da execução e os resultados da verificação pré-execução.

Selecione **Start Run (Iniciar execução)**.

Conforme o desejado, monitore a execução na tela Sequencing (Sequenciamento).

Realize uma limpeza pós-execução usando água sem nuclease misturada com hipoclorito de sódio.

Clusterização

Durante a clusterização, moléculas de DNA em fita simples são ligadas à superfície da lâmina de fluxo e, em seguida, amplificadas por ponte para formar clusters.

Sequenciamento

Após a clusterização, são geradas imagens deles com o uso de combinações de filtro e LED específicas para cada um dos quatro didesoxinucleotídeos marcados de forma fluorescente. Após a conclusão da geração da imagem de um bloco da lâmina de fluxo, a lâmina de fluxo é movida de lugar para expor o próximo bloco. O processo é repetido até que a imagem de todos os blocos seja gerada. Após a análise das imagens, o programa realiza uma chamada de base, filtragem e pontuação de qualidade.

Análise

Após a conclusão da execução, o ForenSeq Universal Analysis Software executa automaticamente outra análise. A análise é monitorada usando uma conexão com a Internet de outro computador. Consulte o *Guia do ForenSeq Universal Analysis Software (nº da peça 15053876)*.

Preparação do cartucho de reagentes

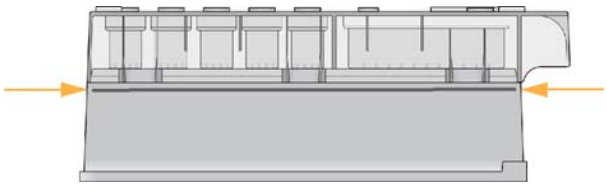
As instruções a seguir descrevem como descongelar o cartucho de reagentes utilizando um banho-maria em temperatura ambiente. Este método requer cerca de uma hora.

OBSERVAÇÃO
Um Cartucho de reagentes MiSeq FGx funciona com execuções de sequenciamento ForenSeq e não funciona com as execuções RUO. Ao executar uma execução de sequenciamento RUO, use um cartucho de reagentes MiSeq padrão.

1 Remova o cartucho de reagentes do armazenamento de -25°C a -15°C.

2 Coloque o cartucho de reagentes em banho-maria contendo água desionizada em temperatura ambiente para submergir a base do cartucho de reagentes até a linha de água impressa no cartucho de reagentes. Não permita que a água exceda a linha de água máxima.

Figura 30 Linha de água máxima



3 Deixe o cartucho de reagentes descongelar em banho-maria em temperatura ambiente por cerca de 60 a 90 minutos ou até estar completamente descongelado.

4 Retire o cartucho do banho-maria e bata-o levemente na bancada para retirar a água da base do cartucho. Seque a base do cartucho. Certifique-se de que a água não tenha respingado sobre o cartucho de reagentes.

Inspeção do cartucho de reagentes

1 Inverta o cartucho de reagentes dez vezes para misturar os reagentes descongelados e, em seguida, inspecione visualmente se todas as posições estão descongeladas.

OBSERVAÇÃO
É fundamental que os reagentes no cartucho sejam totalmente descongelados e misturados para garantir o sequenciamento adequado.

2 Inspecione visualmente os reagentes nas posições 1, 2 e 4 para se certificar de que estejam totalmente misturados e sem precipitados.

3 Bata o cartucho levemente na bancada para reduzir as bolhas de ar nos reagentes.

OBSERVAÇÃO
Os tubos do aspirador de líquidos do MiSeq FGx vão para o fundo de cada reservatório para aspirar os reagentes; portanto, é importante que os reservatórios não tenham bolhas de ar.

4 Coloque o cartucho de reagentes no gelo ou reserve entre 2°C e 8°C (por um máximo de 6 horas) até que você esteja pronto para configurar a execução. Para melhores resultados, prossiga diretamente para o carregamento da amostra e a configuração da execução.

Carregamento de bibliotecas de amostras no cartucho

OBSERVAÇÃO
Se você estiver realizando uma execução RUO, siga as instruções de carregamento de amostra em *Carregamento de bibliotecas de amostras no cartucho para RUO* na página 43

Depois de ter preparado para uso o cartucho de reagentes do MiSeq FGx, você está pronto para carregar as amostras.

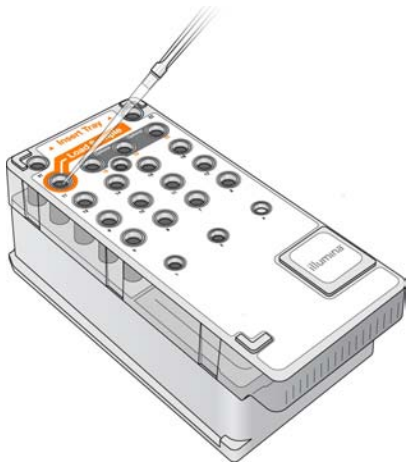
1 Use um lenço de papel de laboratório com poucos fiapos para limpar a vedação que cobre o reservatório marcado como **Load Samples (Carregar amostras)**.

2 Use a ponta de uma pipeta limpa de 1 ml para perfurar a vedação que cobre o reservatório marcado como **Load Samples (Carregar amostras)**.

OBSERVAÇÃO
Não fure nenhuma outra posição do reagente. Outras posições do reagente são furadas automaticamente durante a execução.

3 Com a pipeta, adicione 600 µl de suas bibliotecas de amostra de **DNL** no reservatório **Load Samples (Carregar amostras)**. Evite tocar na vedação enquanto a amostra é colocada.
Verifique se há bolhas de ar no reservatório após o carregamento da amostra. Se houver, bata levemente o cartucho na bancada para liberar as bolhas.

Figura 31 Carregamento de bibliotecas



4 Vá diretamente para as etapas de configuração da execução usando a interface do MiSeq FGx Control Software.

Carregamento de bibliotecas de amostras no cartucho para RUO

OBSERVAÇÃO

Se for necessário para o seu tipo de biblioteca, desnature e dilua as bibliotecas, e adicione o controle opcional do PhiX. Consulte *Como preparar as bibliotecas de DNA para o sequenciamento no MiSeq (nº da peça 15039740)*.

Essa etapa não se aplica a todos os tipos de bibliotecas. Alguns métodos de preparação de amostras Illumina resultam em uma concentração normalizada de bibliotecas agrupadas pronta para uso. Consulte o guia de preparação de amostras do kit utilizado para preparar bibliotecas de amostras.

OBSERVAÇÃO

Se você estiver usando primers personalizados, prepare os primers e a planilha de amostras conforme descrito em *Uso de primers personalizados no MiSeq (nº da peça 15041638)*.

Depois de ter preparado para uso o cartucho de reagentes do MiSeq FGx, você está pronto para carregar as amostras.

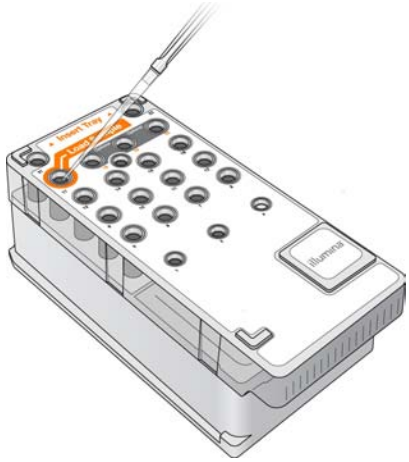
1. Use um lenço de papel de laboratório com poucos fiapos para limpar a vedação que cobre o reservatório marcado como **Load Samples (Carregar amostras)**.
2. Use a ponta de uma pipeta limpa de 1 ml para perfurar a vedação que cobre o reservatório marcado como **Load Samples (Carregar amostras)**.

   OBSERVAÇÃO

   Não fure nenhuma outra posição do reagente. Outras posições do reagente são furadas automaticamente durante a execução.

3. Com a pipeta, adicione 600 µl das bibliotecas preparadas no reservatório **Load Samples (Carregar amostras)**. Evite tocar na vedação enquanto a amostra é colocada. Verifique se há bolhas de ar no reservatório após o carregamento da amostra. Se houver, bata levemente o cartucho na bancada para liberar as bolhas.

   Figura 32 Carregamento de bibliotecas



4. Vá diretamente para as etapas de configuração da execução usando a interface do MiSeq FGx Control Software.

Login e seleção do tipo de execução

1 Na tela de login, digite seu nome de usuário e sua senha do ForenSeq Universal Analysis Software e selecione **Next (Próximo)**.

2 Na tela Welcome (Boas-vindas), selecione **Sequence (Sequência)**.

3 Quando a tela Select Run Type (Selecionar tipo de execução) for exibida, selecione **Forensic Genomics (Genômica forense)** ou **Research Use Only Run (Execução somente pesquisa)**.

Figura 33 Selecionar tipo de execução

4 Siga as solicitações para carregar a lâmina de fluxo e os reagentes e para configurar a execução (descrito nas seções a seguir).

Limpeza da lâmina de fluxo

A lâmina de fluxo está imersa no tampão de armazenamento em um recipiente da lâmina de fluxo.

1 Coloque um novo par de luvas sem pó.

2 Usando uma pinça plástica, segure a lâmina de fluxo pela base do cartucho plástico e retire do recipiente da lâmina de fluxo.

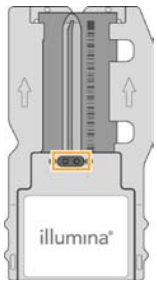
Figura 34 Remoção da lâmina de fluxo

3 Enxágue levemente a lâmina de fluxo com água sem nuclease, tirando cuidadosamente o excesso de sais do vidro e do cartucho plástico. O excesso de sais pode afetar o assentamento da lâmina de fluxo no instrumento. Se os sais secarem na área de imagem, a imagem também poderá ser afetada.

Figura 35 Enxágue da lâmina de fluxo

4 Tomando cuidado em torno da junta preta das portas da lâmina de fluxo (circulada em laranja na ilustração abaixo), seque completamente a lâmina de fluxo e o cartucho, usando um tecido para limpeza de lentes sem fiapos. Seque delicadamente a área da junta e o vidro adjacente.

Figura 36 Junta e portas da lâmina de fluxo



5 Usando um tecido com álcool, limpe o vidro da lâmina de fluxo. Verifique se há manchas ou impressões digitais no vidro e se há fiapos ou fibras de tecido. Evite usar a compressa com álcool no poro de entrada da lâmina de fluxo.

Figura 37 Secagem da lâmina de fluxo

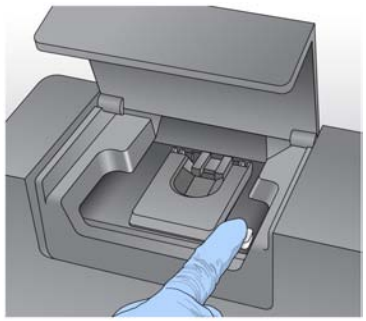
6 Seque o excesso de álcool com um tecido de limpeza de lentes sem fiapos. Inspecione visualmente para se certificar de que as portas da lâmina de fluxo não têm obstruções e que a junta está bem assentada em torno das portas da lâmina de fluxo.
Se a junta parecer estar desalojada, pressione-a suavemente de volta no lugar até que esteja bem em volta das portas da lâmina de fluxo.

Carregamento da lâmina de fluxo

A tela Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo) solicita o carregamento da lâmina de fluxo.

1 Levante a porta do compartimento da lâmina de fluxo e depois aperte o botão de liberação à direita da trava da lâmina de fluxo. A trava da lâmina de fluxo se abre.

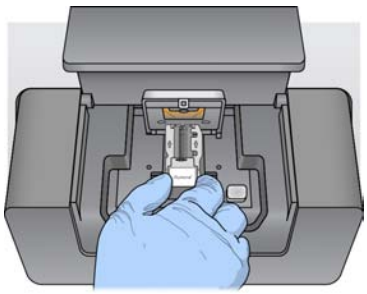
Figura 38 Abertura da trava da lâmina de fluxo



2 Inspecione visualmente a plataforma da lâmina de fluxo para verificar se há fiapos. Caso haja fiapos ou outros detritos, limpe a plataforma da lâmina de fluxo usando uma compressa com álcool ou um tecido sem fiapos umedecido com etanol ou isopropanol. Limpe cuidadosamente a superfície da plataforma da lâmina de fluxo até que ela esteja limpa e seca.

3 Segurando a lâmina de fluxo pelas bordas do cartucho da lâmina de fluxo, coloque a lâmina na plataforma.

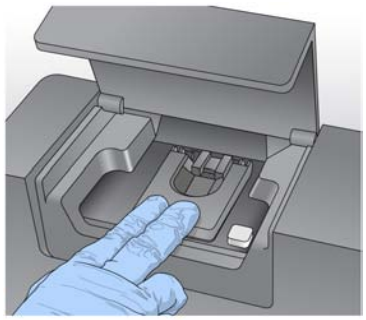
Figura 39 Colocação da lâmina de fluxo na plataforma



4 Pressione delicadamente a trava para fechá-la sobre a lâmina de fluxo.

OBSERVAÇÃO
Quando a trava da lâmina de fluxo está fechada, dois pinos de alinhamento próximos à dobradiça da trava se alinham e posicionam a lâmina de fluxo. Um clique audível indica que a trava da lâmina de fluxo está firme.

Figura 40 Fechamento da trava da lâmina de fluxo



5 Verifique o canto inferior esquerdo da tela para confirmar que o RFID da lâmina de fluxo foi lido com sucesso.

OBSERVAÇÃO

No caso do RFID não poder ser lido, as informações de identificação podem ser introduzidas manualmente. No entanto, o software permite que apenas um dos três componentes marcados como RFID (célula de fluxo, cartucho de reagentes, Solução SBS (PR2)) falhe. Para obter mais informações, consulte *Resolução da falha de leitura do RFID* na página 68.

6 Feche a porta do compartimento da lâmina de fluxo.

7 Selecione **Next (Próximo)** na tela Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo). A tela Load Reagents (Carregar reagentes) se abrirá.

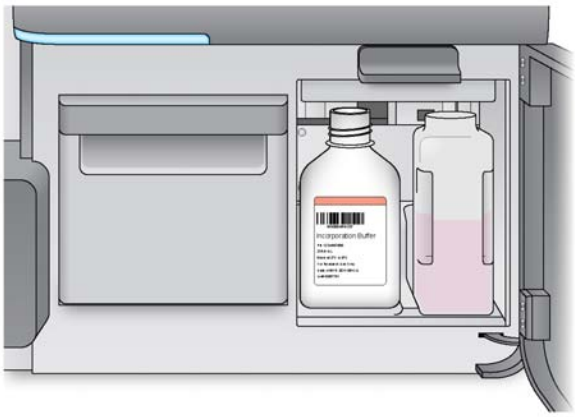
Carregamento de reagentes

Há duas etapas para carregar os reagentes. Primeiro, carregue o frasco de Solução SBS (PR2), verifique se o frasco de resíduos está vazio e, em seguida, carregue o cartucho de reagentes.

Carregamento de Solução SBS (PR2) e verificação do frasco de resíduos

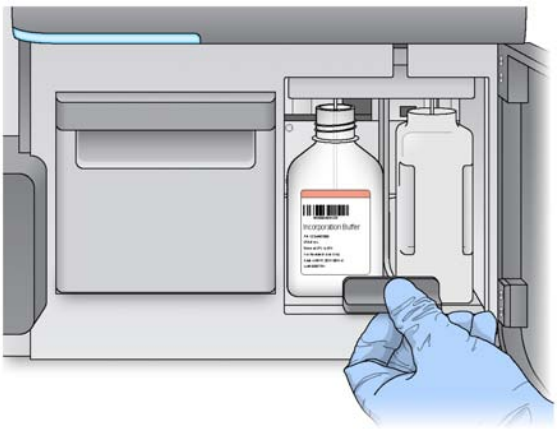
1. Remova o frasco de Solução SBS (PR2) do armazenamento de 2 °C a 8 °C. Inverta suavemente o frasco do Solução SBS (PR2) para misturar e remova a tampa.
2. Abra a porta do compartimento de reagentes.
3. Levante a alça do aspirador de líquidos até que ela trave.
4. Coloque o frasco de Solução SBS (PR2) na reentrância situada à direita do refrigerador de reagentes.

Figura 41 Carregamento do frasco de Solução SBS (PR2)



5. Verifique se o frasco de resíduos está vazio. Se ele não estiver vazio, esvazie o conteúdo dentro do recipiente para resíduos adequado.
6. Abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos. O aspirador deve descer nos frascos de resíduos e de Solução SBS (PR2).

Figura 42 Abaixe a alça do aspirador de líquidos



7 Verifique o canto inferior esquerdo da tela para confirmar se o RFID do frasco de Solução SBS (PR2) foi lido com sucesso.

OBSERVAÇÃO
No caso do RFID não poder ser lido, as informações de identificação podem ser introduzidas manualmente. No entanto, o software permite que apenas um dos três componentes marcados como RFID (célula de fluxo, cartucho de reagentes, Solução SBS (PR2)) falhe em uma execução genômica forense. Para obter mais informações, consulte *Resolução da falha de leitura do RFID* na página 68.

8 Selecione **Next (Próximo)** na tela Load Reagents (Carregar reagentes).

Carregamento do cartucho de reagentes

OBSERVAÇÃO
Não deixe a porta do refrigerador de reagentes aberta por longos períodos de tempo.

1 Abra a porta do refrigerador de reagentes.

2 Segure o cartucho de reagentes na extremidade com o rótulo da Illumina e introduza-o no refrigerador de reagentes até o fundo.

Figura 43 Carregamento do cartucho de reagentes

3 Feche a porta do refrigerador de reagentes.

4 Verifique o canto inferior esquerdo da tela para confirmar que o RFID do cartucho de reagentes foi lido com sucesso.

OBSERVAÇÃO
No caso do RFID não poder ser lido, as informações de identificação podem ser introduzidas manualmente. No entanto, o software permite que apenas um dos três componentes marcados como RFID (célula de fluxo, cartucho de reagentes, Solução SBS (PR2)) falhe. Para obter mais informações, consulte *Resolução da falha de leitura do RFID* na página 68.

5 Feche a porta do compartimento de reagentes.

6 Selecione **Next (Próximo)** na tela Load Reagents (Carregar reagentes). A tela Review (Revisão) se abrirá.

Início da execução

Depois de carregar a lâmina de fluxo e os reagentes, revise os parâmetros da execução e realize uma verificação pré-execução antes de iniciar a execução.

Revisão dos parâmetros da execução

1. Revise o nome da lista de trabalho, o fluxo de trabalho da análise e o tamanho da leitura. No modo RUO, esses parâmetros são especificados na planilha de amostra.
2. No modo RUO, revise os locais da pasta no canto inferior esquerdo.
   Se forem necessárias alterações, selecione **Change Folders (Alterar pastas)**. Quando as alterações forem concluídas, selecione **Save (Salvar)** e depois **Next (Próximo)**.
3. Selecione **Next (Próximo)**. A tela Pre-Run Check (Verificação pré-execução) será aberta.

Revisão da verificação da pré-execução

Antes de iniciar a execução, o sistema executa uma verificação de todos os componentes, espaço em disco e conexões de rede da execução.

Se algum item não passar na verificação pré-execução, uma mensagem com instruções sobre como corrigir o erro aparecerá na tela. Para obter mais informações, consulte *Resolução dos erros de configuração da execução* na página 67.

Quando todos os itens passarem na verificação pré-execução, selecione **Start Run (Iniciar execução)**.

Observação importante antes do início da execução

ADVERTÊNCIA

O MiSeq FGx é sensível à vibração. Tocar no instrumento depois de iniciar uma execução pode afetar negativamente os resultados do sequenciamento.

Depois de selecionar **Start Run (Iniciar execução)**, não abra o compartimento da lâmina de fluxo ou as portas do compartimento do reagente nem toque no monitor do instrumento, exceto para pausar a execução. Para obter mais informações, consulte *Pausa na execução* na página 33.

Monitoramento da execução

1 Durante a execução, monitore o progresso, as intensidades e as pontuações de qualidade da execução na tela Sequencing (Sequenciamento). A tela Sequencing (Sequenciamento) é somente para exibição. Para obter mais informações, consulte *Tela Sequencing (Sequenciamento)* na página 24. Para uma execução RUO, consulte *Tela Sequencing (Sequenciamento) para RUO* na página 29.

2 Quando a execução for concluída, o botão Next (Próximo) aparecerá. Revise os resultados na tela Sequencing (Sequenciamento) antes de prosseguir.

OBSERVAÇÃO

A tela Sequencing (Sequenciamento) permanece visível até que o botão Next (Próximo) seja selecionado. Depois que o botão Next (Próximo) é selecionado, não é possível retornar à tela Sequencing (sequenciamento).

3 Selecione **Next (Próximo)** para sair da tela Sequencing (Sequenciamento) e prosseguir para uma limpeza pós-execução.

Métricas da execução

As métricas de execução aparecem na tela Sequencing (Sequenciamento) em diferentes pontos em uma execução. Durante as etapas de clusterização, não aparece nenhuma métrica. Após o início do sequenciamento, as seguintes métricas aparecem nos ciclos indicados:

Métrica	Kit	Ciclo
Intensidade	Kits de reagentes do MiSeq FGx	Ciclo 1-7
	Kits de reagentes do MiSeq RUO, v3	Ciclo 1-7
	Kits de reagentes do MiSeq RUO, v2	Ciclo 1-4
	Kits de reagentes do MiSeq RUO, v1	Ciclo 1-4
Intensidade e densidade dos clusters	Kits de reagentes do MiSeq FGx	Ciclo 8-25
	Kits de reagentes do MiSeq RUO, v3	Ciclo 8-25
	Kits de reagentes do MiSeq RUO, v2	Ciclo 5-25
	Kits de reagentes do MiSeq RUO, v1	Ciclo 5-25
Intensidade, densidade dos clusters % PF, rendimento e pontuações Q	Kits de reagentes do MiSeq FGx	Ciclo 26 até a conclusão da execução
	Kits de reagentes do MiSeq RUO, v3	
	Kits de reagentes do MiSeq RUO, v2	
	Kits de reagentes do MiSeq RUO, v1	

Procedimentos da manutenção

Capítulo 4

Introdução 54
Realização de uma limpeza pós-execução 55
Realização de uma limpeza de manutenção 58
Realização de uma limpeza de espera 61
Desligamento do instrumento 63

Introdução

Sempre realize uma limpeza no instrumento depois de completar uma execução de sequenciamento.

Limpezas regulares no instrumento garantem um desempenho contínuo das seguintes formas:

- Remove os reagentes remanescentes das linhas de fluxo de reagentes e dos aspiradores de líquidos
- Impede o acúmulo de sal e a cristalização nas linhas de fluxo de reagentes e nos aspiradores de líquidos
- Impede a contaminação cruzada com a execução anterior

Frequência da manutenção

Execute as atividades de manutenção descritas neste capítulo de acordo com os intervalos exibidos nas tabelas abaixo.

Tabela 1 Manutenção durante o funcionamento normal

Atividade	Diária	Mensal	Conforme necessário
Limpeza pós-execução	Após cada execução		
Limpeza de manutenção		X	
Limpeza de espera			Preparação para período ocioso (≥ 7 dias sem utilização)
Desligamento do instrumento			X

Tabela 2 Manutenção durante o período ocioso (≥ 7 dias sem utilização)

Atividade	Diária	Mensal	Conforme necessário
Limpeza de espera		X	
Desligamento do instrumento			X

Manutenção preventiva

A Illumina recomenda uma manutenção preventiva por ano. Se você não estiver vinculado a um contrato de serviço, entre em contato com seu gerente de conta territorial ou suporte técnico da Illumina para contratar um serviço de manutenção preventiva faturável.

Realização de uma limpeza pós-execução

Sempre realize uma limpeza no instrumento depois de completar uma execução de sequenciamento. Siga as instruções do software para carregar os componentes e realizar a limpeza. Cada limpeza pós-execução demora aproximadamente 30 minutos.

OBSERVAÇÃO
A limpeza pós-execução contém hipoclorito de sódio. ***Não*** use hipoclorito de sódio para uma limpeza de manutenção ou uma limpeza de espera.

Em uma próxima execução, o programa não prosseguirá para as etapas de configuração de execução até que uma limpeza seja executada.

OBSERVAÇÃO
Deixe a lâmina de fluxo usada no instrumento. Uma lâmina de fluxo deve ser carregada no instrumento para a realização de uma limpeza.

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário

- Tween 20 (Sigma-Aldrich, nº do catálogo P7949)
- Hipoclorito de sódio
- Água sem nuclease

Procedimento

1. Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água sem nuclease da seguinte maneira:
   a. Adicione 5 ml de Tween 20 100% a 45 ml de água sem nuclease. Esses volumes resultam em 10%, Tween 20.
   b. Adicione 25 ml de Tween 20 10% a 475 ml de água sem nuclease. Esses volumes resultam em uma solução de limpeza de 0,5% e Tween 20.
   c. Inverta várias vezes para misturar.
2. Prepare a solução de limpeza com hipoclorito de sódio e água sem nuclease da seguinte maneira:
   a. Acrescente 30 µl de 6% de hipoclorito de sódio a 870 µl de água sem nuclease. Esses volumes resultam em uma diluição de hipoclorito de sódio na proporção 1:30.
   b. Acrescente 50 µl da diluição de hipoclorito de sódio a 1:30 em 950 µl de água sem nuclease em um tubo MiSeq fornecido pela Illumina (nº da peça MS-102-9999).

      OBSERVAÇÃO
      Verifique a porcentagem de hipoclorito de sódio no rótulo do produto.
      É importante usar a concentração correta de hipoclorito de sódio. Se a concentração for muito alta, poderá causar falha na clusterização nas próximas execuções. Se não houver hipoclorito de sódio a 6%, faça uma solução de 1 ml com 0,01% hipoclorito de sódio em água sem nuclease.

   c. Misture bem a diluição do hipoclorito de sódio e da água, realizando a pipetagem para cima e para baixo com uma micropipeta P1000.
3. Prepare os componentes de limpeza com a solução de limpeza fresca com Tween 20 0,5% da seguinte forma:
   a. Adicione 6 ml da solução de limpeza em cada reservatório da bandeja de limpeza.
   b. Adicione 350 ml da solução de limpeza no frasco de limpeza de 500 ml.

4 Insira o tubo MiSeq contendo a solução de limpeza com 0,01% de hipoclorito de sódio na posição 17 da bandeja de limpeza até que o pescoço do tubo seja limpo com a bandeja. O tubo desloca a solução de limpeza com Tween 20 e água sem nuclease da posição 17.

Figura 44 Tubo MiSeq na posição 17 da bandeja de limpeza

OBSERVAÇÃO
Insira o tubo MiSeq com hipoclorito de sódio somente na posição 17 da bandeja. A inserção do tubo em outra posição pode causar falha na clusterização nas próximas execuções, além de poder danificar o sistema de fluxo de reagentes do instrumento MiSeq FGx.

5 Na tela de limpeza pós-execução, selecione **Start Wash (Iniciar limpeza)**. O programa levanta automaticamente os aspiradores de líquidos do refrigerador de reagentes. Aguarde alguns segundos para ter certeza de que os aspiradores de líquido estejam totalmente erguidos antes de continuar.

6 Abra a porta do compartimento de reagentes, a porta do refrigerador de reagentes e remova o cartucho de reagentes usado do refrigerador.

7 Deslize a bandeja de limpeza no refrigerador de reagentes até o fundo e feche a porta do refrigerador de reagentes.

8 Levante a alça do aspirador de líquidos na frente do frasco de Solução SBS (PR2) e do frasco de limpeza até que ela trave.

9 Remova o frasco de Solução SBS (PR2) e substitua-o pelo frasco de limpeza.

OBSERVAÇÃO
Descarte o frasco de Solução SBS (PR2) após cada execução. Não reutilize nenhum Solução SBS (PR2) que sobrar.

10 Remova o frasco de resíduos e descarte o conteúdo de forma apropriada. Coloque o frasco de resíduos de volta no compartimento de reagentes.

ADVERTÊNCIA
Este conjunto de reagentes contém formamida, uma amida alifática que pode ser tóxica para o sistema reprodutivo. Podem ocorrer ferimentos por meio de inalação, ingestão e contato com a pele e com os olhos. Descarte recipientes e todo o conteúdo não utilizado em conformidade com as normas de segurança governamentais de sua região. Para obter mais informações, consulte a SDS deste kit em support.illumina.com/sds.html.

11 Abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos, deixando que o aspirador desça até os frascos de limpeza e de resíduos.

12 Feche a porta do compartimento de reagentes.

13 Selecione **Next (Próximo)**. A limpeza pós-execução será iniciada.

Quando a limpeza estiver concluída, deixe a lâmina de fluxo, a bandeja e o frasco de limpeza usados contendo a solução de limpeza restante no instrumento. Uma pequena quantidade de solução de limpeza permanece no tubo MiSeq na posição 17.

OBSERVAÇÃO

Os aspiradores de líquidos permanecem na posição para baixo, o que é normal. Deixe a solução de limpeza não utilizada na bandeja e no frasco de limpeza, para evitar que os aspiradores de líquidos sequem e evitar a entrada de ar no sistema.

Realização de uma limpeza de manutenção

Realize uma limpeza de manutenção a cada 7 dias para garantir o melhor desempenho. A limpeza de manutenção inclui uma série de três etapas de limpeza, usando uma solução de limpeza de água sem nuclease misturada com Tween 20. Aguarde aproximadamente 90 minutos para concluir a limpeza.

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário

- Tween 20 (Sigma-Aldrich, nº do catálogo P7949)
- Água sem nuclease

Procedimento

1. Verifique se uma lâmina de fluxo usada está carregada no instrumento.
2. Na tela Welcome (Boas-vindas), selecione **Perform Wash (Realizar limpeza)**.
3. Na tela Perform Wash (Realizar limpeza), selecione **Maintenance Wash (Limpeza de manutenção)**. O programa levanta automaticamente os aspiradores de líquidos do refrigerador de reagentes.

Realização da primeira limpeza

1. Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água sem nuclease da seguinte maneira:
   a. Adicione 5 ml de Tween 20 100% a 45 ml de água sem nuclease. Esses volumes resultam em 10%, Tween 20.
   b. Adicione 25 ml de Tween 20 10% a 475 ml de água sem nuclease. Esses volumes resultam em uma solução de limpeza de 0,5% e Tween 20.
   c. Inverta várias vezes para misturar.
2. Prepare os componentes de limpeza com a solução de limpeza fresca com 0,5% de Tween 20 da seguinte forma:
   a. Adicione 6 ml da solução de limpeza em cada reservatório da bandeja de limpeza.
   b. Adicione 350 ml da solução de limpeza no frasco de limpeza de 500 ml.
3. Carregue a bandeja e o frasco de limpeza no instrumento:
   a. Abra a porta do compartimento de reagentes, a porta do refrigerador de reagentes e remova o cartucho de reagentes usado ou a bandeja de limpeza do refrigerador.
   b. Deslize a bandeja de limpeza no refrigerador de reagentes até o fundo. Feche a porta do refrigerador de reagentes.
   c. Levante a alça do aspirador de líquidos na frente do frasco de resíduos e do frasco de Solução SBS (PR2) até que ela trave, e substitua o frasco de Solução SBS (PR2) por um frasco de limpeza.

      OBSERVAÇÃO
      Descarte o frasco de Solução SBS (PR2) após cada corrida. Não reutilize nenhum Solução SBS (PR2) que sobrar.

   d. Remova o frasco de resíduos e descarte o conteúdo de forma apropriada. Coloque o frasco de resíduos de volta no compartimento de reagentes.
   e. Abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos, deixando que o aspirador desça até os frascos de limpeza e de resíduos.
   f. Feche a porta do compartimento de reagentes.
4. Selecione **Next (Próximo)**. A primeira limpeza é iniciada.

Realização da segunda limpeza

OBSERVAÇÃO
Utilize sempre uma solução de limpeza fresca para cada etapa de limpeza. A reutilização da solução de limpezas anteriores pode devolver resíduos para as linhas de fluxo de reagentes.

1. Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água sem nuclease da seguinte maneira:
   a. Adicione 5 ml de Tween 20 100% a 45 ml de água sem nuclease. Esses volumes resultam em 10%, Tween 20.
   b. Adicione 25 ml de Tween 20 10% a 475 ml de água sem nuclease. Esses volumes resultam em uma solução de limpeza de 0,5% e Tween 20.
   c. Inverta várias vezes para misturar.
2. Quando a primeira limpeza for concluída, remova a bandeja e o frasco de limpeza e descarte a solução de limpeza restante.
3. Encha os componentes de limpeza com a solução de limpeza fresca com Tween 20 0,5% da seguinte forma:
   a. Adicione 6 ml da solução de limpeza em cada reservatório da bandeja de limpeza.
   b. Adicione 350 ml da solução de limpeza no frasco de limpeza de 500 ml.
4. Carregue a bandeja e o frasco de limpeza da seguinte forma:
   a. Deslize a bandeja de limpeza no refrigerador de reagentes até o fundo. Feche a porta do refrigerador de reagentes.
   b. Carregue o frasco de limpeza e abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos, deixando que o aspirador desça até os frascos de limpeza e de resíduos.
   c. Feche a porta do compartimento de reagentes.
5. Selecione **Next (Próximo)**. A segunda limpeza é iniciada.

Realização da limpeza final

1. Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água sem nuclease da seguinte maneira:
   a. Adicione 5 ml de Tween 20 100% a 45 ml de água sem nuclease. Esses volumes resultam em 10%, Tween 20.
   b. Adicione 25 ml de Tween 20 10% a 475 ml de água sem nuclease. Esses volumes resultam em uma solução de limpeza de 0,5% e Tween 20.
   c. Inverta várias vezes para misturar.
2. Quando a segunda limpeza for concluída, remova a bandeja e o frasco de limpeza e descarte a solução de limpeza restante.
3. Encha os componentes de limpeza com a solução de limpeza fresca com Tween 20 0,5% da seguinte forma:
   a. Adicione 6 ml da solução de limpeza em cada reservatório da bandeja de limpeza.
   b. Adicione 350 ml da solução de limpeza no frasco de limpeza de 500 ml.
4. Carregue a bandeja e o frasco de limpeza da seguinte forma:
   a. Deslize a bandeja de limpeza no refrigerador de reagentes até o fundo. Feche a porta do refrigerador de reagentes.
   b. Carregue o frasco de limpeza e abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos, deixando que o aspirador desça até os frascos de limpeza e de resíduos.
   c. Feche a porta do compartimento de reagentes.

5 Selecione **Next (Próximo)**. A limpeza final é iniciada.

Após a limpeza

Quando a limpeza estiver concluída, deixe a lâmina de fluxo, a bandeja e o frasco de limpeza usados contendo a solução de limpeza restante no instrumento.

OBSERVAÇÃO

Os aspiradores de líquidos permanecem na posição para baixo, o que é normal. Deixe a solução de limpeza não utilizada na bandeja e no frasco de limpeza, para evitar que os aspiradores de líquidos sequem e evitar a entrada de ar no sistema.

Realização de uma limpeza de espera

Caso não se espera o uso do instrumento nos próximos sete dias, prepare o instrumento para ficar ocioso realizando uma limpeza de espera. Uma limpeza de espera realiza duas limpezas consecutivas que limpam todas as posições dos reagentes restantes ou do acúmulo de sal. Cada limpeza demora aproximadamente 60 minutos. Reserve cerca de 2 horas para completar a limpeza de espera.

Quando a limpeza de espera estiver concluída, o instrumento entrará no modo de espera e aparecerá uma mensagem na tela Welcome (Boas-vindas), indicando o status do instrumento. Quando o instrumento estiver no modo de espera, uma limpeza de manutenção deverá ser executada antes do início de uma execução de sequenciamento. Consulte *Frequência da manutenção* na página 54 para obter informações sobre quando realizar limpezas.

OBSERVAÇÃO
A Illumina recomenda repetir a limpeza para standby ***a cada 30 dias*** que o instrumento permanecer ocioso.

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário

- Tween 20 (Sigma-Aldrich, nº do catálogo P7949)
- Água sem nuclease

Procedimento

1. Certifique-se de que uma lâmina de fluxo usada esteja carregada no instrumento.
2. Na tela Welcome (Boas-vindas), selecione **Perform Wash (Realizar limpeza)**.
3. Na tela Wash Options (Opções de limpeza), selecione **Standby Wash (Limpeza de espera)**. O programa levanta automaticamente os aspiradores de líquidos do refrigerador de reagentes.

Realização da primeira limpeza

1. Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água sem nuclease da seguinte maneira:
   a. Adicione 5 ml de Tween 20 100% a 45 ml de água sem nuclease. Esses volumes resultam em 10%, Tween 20.
   b. Adicione 25 ml de Tween 20 10% a 475 ml de água sem nuclease. Esses volumes resultam em uma solução de limpeza de 0,5% e Tween 20.
   c. Inverta várias vezes para misturar.
2. Prepare os componentes de limpeza com a solução de limpeza fresca com 0,5% de Tween 20 da seguinte forma:
   a. Adicione 6 ml da solução de limpeza em cada reservatório da bandeja de limpeza.
   b. Adicione 350 ml da solução de limpeza no frasco de limpeza de 500 ml.
3. Carregue a bandeja e o frasco de limpeza no instrumento:
   a. Abra a porta do compartimento de reagentes, a porta do refrigerador de reagentes e remova o cartucho de reagentes usado ou a bandeja de limpeza do refrigerador.
   b. Deslize a bandeja de limpeza no refrigerador de reagentes até o fundo. Feche a porta do refrigerador de reagentes.

c Levante a alça do aspirador de líquidos na frente do frasco de resíduos e do frasco de Solução SBS (PR2) até que ela trave, e substitua o frasco de Solução SBS (PR2) por um frasco de limpeza.

OBSERVAÇÃO
Descarte o frasco de Solução SBS (PR2) após cada corrida. Não reutilize nenhum Solução SBS (PR2) que sobrar.

d Remova o frasco de resíduos e descarte o conteúdo de forma apropriada. Coloque o frasco de resíduos de volta no compartimento de reagentes.

e Abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos, deixando que o aspirador desça até os frascos de limpeza e de resíduos.

f Feche a porta do compartimento de reagentes.

4 Selecione **Next (Próximo)**. A primeira limpeza é iniciada.

Realização da segunda limpeza

OBSERVAÇÃO
Utilize sempre uma solução de limpeza fresca para cada etapa de limpeza. A reutilização da solução de limpezas anteriores pode devolver resíduos para as linhas de fluxo de reagentes.

1 Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água sem nuclease da seguinte maneira:

a Adicione 5 ml de Tween 20 100% a 45 ml de água sem nuclease. Esses volumes resultam em 10%, Tween 20.

b Adicione 25 ml de Tween 20 10% a 475 ml de água sem nuclease. Esses volumes resultam em uma solução de limpeza de 0,5% e Tween 20.

c Inverta várias vezes para misturar.

2 Quando a primeira limpeza for concluída, remova a bandeja e o frasco de limpeza e descarte a solução de limpeza restante.

3 Encha os componentes de limpeza com a solução de limpeza fresca com Tween 20 0,5% da seguinte forma:

a Adicione 6 ml da solução de limpeza em cada reservatório da bandeja de limpeza.

b Adicione 350 ml da solução de limpeza no frasco de limpeza de 500 ml.

4 Carregue a bandeja e o frasco de limpeza da seguinte forma:

a Deslize a bandeja de limpeza no refrigerador de reagentes até o fundo. Feche a porta do refrigerador de reagentes.

b Carregue o frasco de limpeza e abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos, deixando que o aspirador desça até os frascos de limpeza e de resíduos.

c Feche a porta do compartimento de reagentes.

5 Selecione **Next (Próximo)**. A segunda limpeza é iniciada.

Após a limpeza

Quando a limpeza estiver concluída, deixe a lâmina de fluxo, a bandeja e o frasco de limpeza usados contendo a solução de limpeza restante no instrumento.

OBSERVAÇÃO
Os aspiradores de líquidos permanecem na posição para baixo, o que é normal. Deixe a solução de limpeza não utilizada na bandeja e no frasco de limpeza, para evitar que os aspiradores de líquidos sequem e evitar a entrada de ar no sistema.

Desligamento do instrumento

É melhor deixar o instrumento ligado em todos os momentos. No entanto, se o instrumento tiver que ser desligado, use o procedimento a seguir para finalizar o Windows e preparar as linhas do fluxo de reagentes.

1 Realize uma limpeza de manutenção. Para mais informações, consulte *Procedimento* na página 58.

2 Remova o frasco de resíduos e descarte o conteúdo de forma apropriada. Coloque o frasco de resíduos de volta no compartimento de reagentes.

3 Feche a porta do compartimento de reagentes.

4 Na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento), selecione **Shut Down (Desligar)**. Esse comando finaliza o software.

Figura 45 Tela Manage Instrument (gerenciar instrumento)

5 Coloque o interruptor na posição OFF (Desligado).

OBSERVAÇÃO

Toda vez que o instrumento for desligado, espere no ***mínimo*** 60 segundos antes de colocar o interruptor na posição ON (Ligado).

Solução de problemas

Capítulo 5

Introdução 66
Resolução dos erros de configuração da execução 67
Resolução da falha de leitura do RFID 68
Evitar reinícios durante uma execução 70
Solução de problemas de erro de taxa de fluxo 71
Realização de um teste de volume 72
Medição dos volumes de limpeza esperados 74

Introdução

Esta seção descreve as etapas comuns para solução de problemas a serem seguidas antes de entrar em contato com o suporte técnico da Illumina. Para a maioria dos erros, uma mensagem aparece na tela com instruções para a correção do erro.

Em caso de dúvidas técnicas, visite as páginas de suporte do MiSeq FGx no site da Illumina para ter acesso às perguntas mais frequentes ou faça login com sua conta MyIllumina para acessar os boletins de suporte.

Em caso de problemas com a qualidade ou o desempenho da execução, entre em contato com o suporte técnico da Illumina. Para obter mais informações, consulte *Assistência técnica* na página 77.

O representante do suporte técnico da Illumina poderá solicitar cópias de arquivos específicos da execução para tentar solucionar o problema. Os seguintes arquivos estão localizados no nível da pasta principal de saída da execução:

- SampleSheet.csv se estiver usando o instrumento no modo RUO
- RunParameters.xml
- RunInfo.xml
- Pasta Interop

Resolução dos erros de configuração da execução

Se a verificação da pré-execução encontrar alguma falha, um ícone ✗ vermelho aparecerá ao lado do item. A mensagem que aparece na tela descreve o erro e como corrigi-lo.

Erro	Ação
✗ **Taxa de fluxo medida**	A tela de verificação da taxa de fluxo é aberta. Use a lista drop-down ou o teclado da tela para inserir as seguintes informações: • Solução: **PR2** • Volume: **250** • Taxa de aspiração: **2500** • Taxa de dispensa: **2500** Selecione **Pump (Bombear)**. Se o erro persistir, defina o volume para bombear 500 µl Solução SBS (PR2) e repita o processo. Quando os fluidos tiverem sido bombeados, selecione **Restart Check (Reiniciar verificação)**. Quando a verificação pré-execução for bem-sucedida, o botão **Start Run (Iniciar execução)** ficará ativo. Se a verificação de fluxo falhar novamente, recoloque a lâmina de fluxo para certificar-se de que não haja interrupção no fluxo por causa de desalinhamento. Inspecione se há fiapos ou irregularidades na junta da lâmina de fluxo.
✗ **Espaço em disco livre**	Se o espaço em disco estiver baixo, uma mensagem aparecerá indicando quanto espaço em disco é necessário. Use o recurso **Manage Files (Gerenciar arquivos)** para limpar o espaço necessário do computador do instrumento.
✗ **Conexão de rede ativa**	Verifique se o cabo de rede está conectado ao instrumento. Se a conexão de rede não for restaurada, selecione **Reboot (Reiniciar)** na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento) para reiniciar o programa. Se a conexão ainda não for restaurada, selecione **Shut Down (Desligar)** na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento) e depois desligue o instrumento usando o interruptor. Aguarde pelo menos 60 segundos e depois ligue o instrumento e inicie o programa.
✗ **Análise primária pronta**	A análise RTA da execução anterior não está completa. O tempo padrão para que a análise RTA seja concluída é de 1 hora, e uma contagem regressiva aparece na tela. As opções são aguardar uma hora ou selecionar **Terminate Analysis (Encerrar análise)**. A análise do ForenSeq Universal Analysis Software é interrompida para todos os ciclos incompletos.
✗ **Planilha de amostra presente**	Se a planilha de amostra não foi nomeada com a ID do cartucho de reagentes para a execução, o instrumento não conseguirá localizar automaticamente a planilha de amostra apropriada. Navegue até a planilha de amostra para a execução. Se a planilha de amostra foi nomeada com a ID do cartucho de reagentes para a execução, verifique se a planilha de amostra está localizada na pasta de planilhas de amostra padrão. Verifique o local da pasta padrão em Run Options (Opções de execução) na tela Welcome (Boas-vindas). Verifique se a extensão de arquivo da planilha de amostra é *.csv. Se estiver faltando a planilha de amostra, crie uma e a copie para os locais de planilha de amostra especificados em Run Options (Opções de execução). Após localizar uma planilha de amostras, selecione **Restart Check (Reiniciar verificação)**.

Resolução da falha de leitura do RFID

Falhas de RFID acontecem se:

- O componente carregado não faz parte de um kit forense.
- Para uma execução RUO, o componente carregado não faz parte do kit identificado pela planilha de amostra.
- Há uma falha técnica com a marcação RFID no componente.

Os passos a seguir podem ser usados para resolver falhas de RFID causadas por uma falha técnica.

OBSERVAÇÃO

Uma execução é permitida em uma falha de leitura RFID. Se o RFID de dois materiais de consumo não puder ser lido, o programa não avançará para a próxima etapa de configuração da execução. Se isso ocorrer, entre em contato com o suporte técnico da Illumina.

Lâmina de fluxo

1. Sempre repita a leitura do RFID antes de prosseguir. Para fazer isso, abra e feche a porta do compartimento da célula de fluxo.
2. Se o RFID falhar uma segunda vez, abra a porta do compartimento da lâmina de fluxo e remova com cuidado a lâmina de fluxo.
3. Verifique a lâmina de fluxo e a plataforma da lâmina de fluxo em busca de detritos ou sais que possam interromper a leitura RFID.
4. Recoloque a lâmina de fluxo. Verifique se a trava alinha a lâmina de fluxo adequadamente.
5. Feche a porta do compartimento da lâmina de fluxo.
6. Se o RFID continuar falhando, selecione o ícone do teclado para abrir o teclado na tela.
7. Digite o número do código de barras da lâmina de fluxo, localizado no rótulo do recipiente da lâmina de fluxo, bem abaixo do código de barras. Selecione **Done (Concluído)**.
8. Selecione **Next (Próximo)** para avançar para a próxima etapa de configuração da execução.

Frasco de Solução SBS (PR2)

1. Sempre repita a leitura do RFID antes de prosseguir. Para fazer isso, levante e abaixe a alça do aspirador de líquidos.
2. Se o RFID falhar uma segunda vez, abra a porta do compartimento de reagentes. Levante a alça do aspirador de líquidos e remova o frasco Solução SBS (PR2).
3. Verifique o frasco Solução SBS (PR2) e o compartimento de reagentes em busca de detritos ou sais que possam interromper a leitura RFID.
4. Substitua o frasco Solução SBS (PR2) e abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos até que ele fique preso. Os aspiradores de líquido devem descer até os frascos de resíduos e de Solução SBS (PR2).
5. Se o RFID continuar falhando, selecione o ícone do teclado para abrir o teclado na tela.

6 Digite o número do código de barras do frasco de Solução SBS (PR2), localizado na etiqueta do frasco de Solução SBS (PR2), logo abaixo do código de barras. Selecione **Done (Concluído)**.

7 Selecione **Next (Próximo)** para avançar para a próxima etapa de configuração da execução.

Cartucho de reagentes

1 Sempre repita a leitura do RFID antes de prosseguir. Para fazer isso, abra e feche a porta do refrigerador do reagente.

2 Se o RFID falhar uma segunda vez, abra a porta do refrigerador de reagentes e remova o cartucho.

3 Verifique o cartucho de reagentes e o refrigerador de reagentes em busca de detritos ou sais que possam interromper a leitura RFID.

4 Substitua o cartucho de reagentes e feche a porta do refrigerador de reagentes.

5 Se o RFID continuar falhando, selecione **Enter Reagent Kit Barcode (Inserir código de barras do kit de reagentes)**.

6 Digite o número do código de barras do kit de reagente, localizado na etiqueta do kit, bem abaixo do código de barras.

7 Digite o número de peça do cartucho de reagentes, localizado à direita do **REF** na etiqueta do kit de reagentes.

Figura 46 Insira informações do reagente

8 Selecione **Next (Próximo)** para retornar à tela de carregamento de reagentes.

9 Selecione **Next (Próximo)** para avançar para a próxima etapa de configuração da execução.

Evitar reinícios durante uma execução

Se o MiSeq FGx reiniciar durante uma execução, talvez signifique que o software Windows Update na rede esteja configurado para instalar automaticamente as atualizações de software. (Essa configuração deve ser desativada durante a instalação.) Entre em contato com o departamento de TI local a fim de obter ajuda para desativar as atualizações automáticas do sistema operacional Windows, em execução em segundo plano no MiSeq FGx.

OBSERVAÇÃO

Um reinício encerra a execução que não pode ser recuperada. A execução precisa começar novamente desde o princípio.

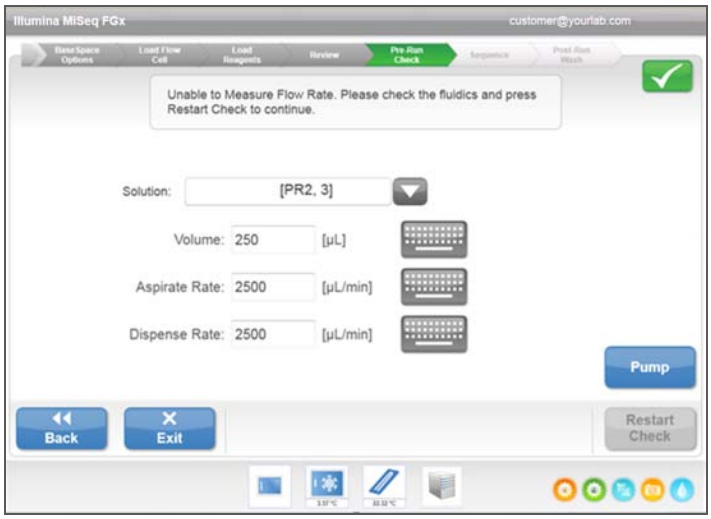
Solução de problemas de erro de taxa de fluxo

A taxa de fluxo é a velocidade com que os fluidos passam através do sistema de fluxo de reagentes (µl/min). Ela é medida antes de cada execução, durante a verificação pré-execução. Se o sistema não conseguir medir a taxa de fluxo, bombeie um volume de reagente (Solução SBS (PR2)) pelo sistema antes de verificar a taxa de fluxo novamente.

1 Use a lista suspensa ou o teclado da tela para inserir as seguintes informações:
- Solução: **PR2**
- Volume: **250 µl**
- Taxa de aspiração: **2500 µl/min**
- Taxa de dispensa: **2500 µl/min**

2 Selecione **Pump (Bombear)**.

Figura 47 Medição da taxa de fluxo



3 Quando a etapa da bomba estiver concluída, selecione **Restart Check (Reiniciar verificação)**.

4 Se o erro persistir, defina o volume para bombear 500 µl de Solução SBS (PR2) e repita o processo mais uma vez. Entre em contato com o suporte técnico da Illumina se a segunda tentativa não resolver o erro.

Realização de um teste de volume

Uma obstrução nas linhas de fluxo de reagentes pode ser a causa da fraca distribuição de reagente ou afetar os resultados do sequenciamento. Se houver suspeita de uma obstrução nas linhas de fluxo de reagentes, realize um teste de volume.

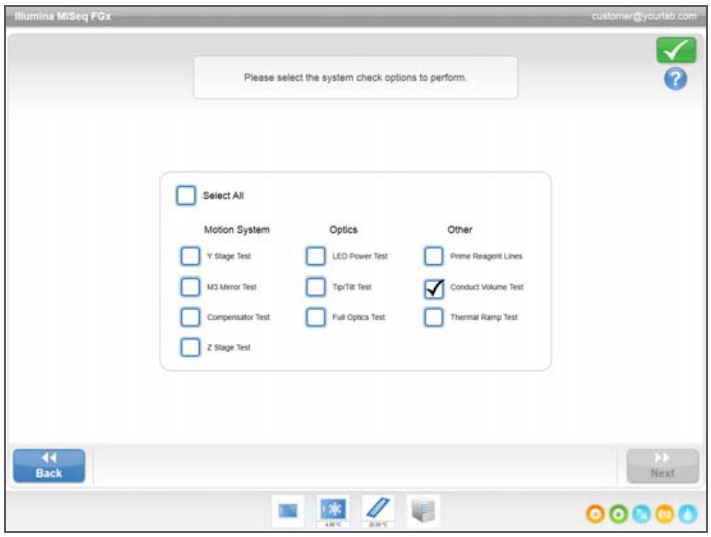
Um teste de volume verifica a integridade do sistema de fluxo de reagentes estimando o volume entre duas bolhas que passam pelos sensores. Para executar um teste de volume, a bandeja e o frasco de limpeza devem ser carregados com água sem nuclease e uma lâmina de fluxo usada deve ser colocada no lugar. Siga as instruções na tela para executar o teste.

1 Verifique se uma lâmina de fluxo usada está carregada no instrumento.

2 Na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento), selecione **System Check (Verificação do sistema)**.

3 Selecione **Conduct Volume Test (Realizar teste de volume)** e depois **Next (Próximo)**.

Figura 48 Tela System Check (verificação do sistema)



4 Encha cada reservatório da bandeja de limpeza com 6 ml de água sem nuclease.

5 Encha o frasco de limpeza de 500 ml com 350 ml de água sem nuclease.

6 Carregue a bandeja e o frasco de limpeza no instrumento.

a Abra a porta do compartimento de reagentes e a porta do refrigerador de reagentes e deslize a bandeja de limpeza pelo refrigerador até o fundo. Feche a porta do refrigerador de reagentes.

b Levante a alça do aspirador de líquidos até que ela trave e carregue o frasco de limpeza.

c Remova o frasco de resíduos e descarte o conteúdo de forma apropriada. Coloque o frasco de resíduos de volta no compartimento de reagentes.

d Abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos, deixando que o aspirador desça até os frascos de limpeza e de resíduos.

7 Depois dos avisos na tela, remova todas as gotas do aspirador de líquidos do frasco de limpeza da seguinte forma:

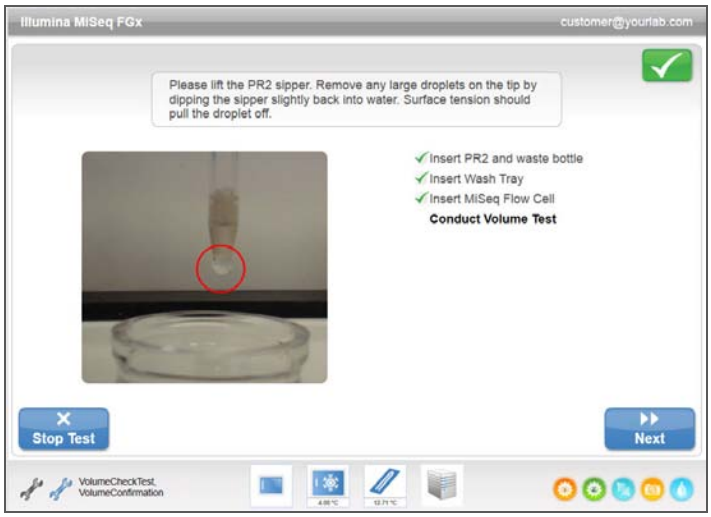
a Quando solicitado, levante lentamente a alça do aspirador de líquidos e verifique se há uma gota de água no aspirador.

b Quando solicitado, abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos o suficiente na água para permitir que a tensão da superfície remova a gota.

c Quando solicitado, levante lentamente a alça do aspirador de líquidos e verifique se há uma gota de água no aspirador.

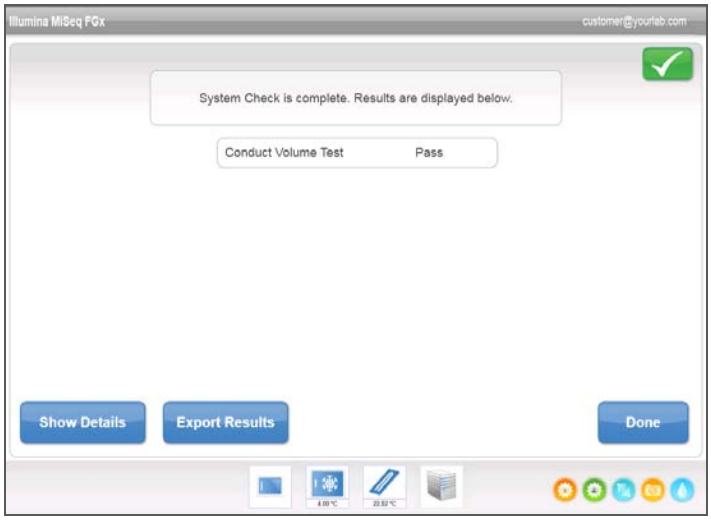
d Quando solicitado, abaixe lenta e completamente a alça do aspirador de líquidos, deixando que o aspirador desça até os frascos de limpeza e de resíduos.

Figura 49 Remoção das gotas do aspirador de líquidos


Illumina MiSeq FGx
customer@yourlab.com
Please lift the PR2 sipper. Remove any large droplets on the tip by dipping the sipper slightly back into water. Surface tension should pull the droplet off.
Insert PR2 and waste bottle
Insert Wash Tray
Insert MiSeq Flow Cell
Conduct Volume Test
Stop Test
Next
VolumeCheckTest, VolumeConfirmation

8 Selecione **Next (Próximo)**. O teste de volume é iniciado.
Quando o teste de volume estiver concluído, os resultados serão exibidos na tela.

Figura 50 Resultados do teste de volume



Se o resultado do teste for negativo, realize uma limpeza de manutenção. Veja *Procedimento* na página 58.

9 Quando a limpeza de manutenção for concluída, repita o teste de volume.

Medição dos volumes de limpeza esperados

A medição dos volumes de limpeza esperados confirma se o sistema de fluxo de reagentes de limpeza está operando com eficiência.

1 Antes de iniciar uma limpeza, esvazie o frasco de resíduos.

2 Quando a limpeza estiver concluída, meça o volume de limpeza no frasco de resíduos.

Tipo de limpeza	Volume de limpeza esperado
Limpeza pós-execução	25,5 ml
Limpeza de espera	46 ml
Limpeza de manutenção	17,25 ml

Índice remissivo

A

agrupar logs 15
ajuda, Live Help 34
ajuda, técnica 77
alça do aspirador de líquidos 5
alertas por e-mail 16
análise
  durante sequenciamento 36
  opções 35
arquivo de manifesto
  cópia para o instrumento 14
assistência técnica 77

B

BaseSpace 26
  conexão 12

C

carregamento 49
carregamento da lâmina de fluxo 22, 26
carregamento de reagentes 23, 27
  cartucho 50
  Solução SBS 49
chamadas de base 25
ciclos em uma leitura 32
como ligar o instrumento 6
compartimento da lâmina de fluxo 3
  componentes
    compartimento da lâmina de fluxo 4
compartimento de reagentes 3, 5
componentes
  compartimento da lâmina de fluxo 3
  compartimento de reagentes 3, 5
  lâmina de fluxo 4
  módulo ótico 3
conexão de rede 67
configuração do instrumento 19
configurações de rede 20
configurações do sistema 20
cópia de arquivos e pastas 14

D

densidade de clusters 24
desativação do instrumento 61
desligamento do instrumento 19, 63
documentação 77
duração da execução 32
duração da leitura 32

E

endereço IP 20
espaço em disco
  pouco espaço em disco 67
  verificação 33
exclusão de arquivos e pastas 14

F

filtro de pureza 25
fixação da lâmina de fluxo 4
fluxo de reagentes
  limpeza 58, 61
  solução de problemas 71-72
fluxo de trabalho
  duração da execução 32
frasco de resíduos 5

G

geração de modelos 31

Í

ícone de alerta de status 13
ícones
  alerta de status 13
  erros e advertências 13
  indicadores de atividade 12
  sensores 12

I

indicadores de atividade 12
indicadores de sensor 12
inicialização 67
intensidades 24
interrupção de uma execução 33
interruptor 6

L

lâmina de fluxo
  carregamento 22, 26, 47
  limpeza 45
  visão geral 4
limpeza
  preparação para o estado ocioso 61
limpeza de espera 13, 61
limpeza de manutenção 13, 58
limpeza pós-execução 55
limpezas
  benefícios da 54
  configurações da limpeza pós-execução 16
  espera 13, 61
  manutenção 13, 58
  pós-execução 55
  preparação para finalizar 63
  volumes esperados 74
Live Help 34
locais das pastas
  configurações padrão 16

M

materiais de consumo
  fornecidos pela Illumina 7
  fornecidos pelo usuário 7
materiais de consumo fornecidos pelo usuário 7
MiSeq Reporter
  visão geral 35
módulo ótico 3
monitoramento da execução 24, 29, 52
movimentação de arquivos e pastas 14

N

nome de domínio 20
nome de usuário 6

O

opções da execução 16

P

pastas de execução
  gerenciamento 14
  nomenclatura 32
  temp, saída, análise 32
pausa na execução 33
planilha de amostras
  cópia para o instrumento 14
  não encontrada 67

Q

Q-scores 24

R

reagentes
  carregamento 23, 27, 49
  em kits 7
Real Time Analysis
  geração de modelos 31
  pasta de execução 32
receitas, gerenciamento 14
referências do genoma 14
refrigerador de reagentes, temperatura 12
reinicialização do software 19
RFID
  cartucho de reagentes 50
  lâmina de fluxo 47
  solução de problemas 68
  Solução SBS 49

S

seleção de uma execução 22
senha 6
sensor da porta da lâmina de fluxo 12
Sequencing Analysis Viewer 29, 52
software
  configuração do instrumento 19
  duração da execução 32
  inicialização 6
  verificação de espaço em disco 33
solução de problemas
  agrupar logs 15
  arquivos específicos da execução para 66
  erros de configuração da execução 67
  fluxo de reagentes 72
  RFID 68
  taxa de fluxo 71
Solução SBS 49
suporte ao cliente 77

T

tamanho da leitura 32
taxa de fluxo, solução de problemas 71
tela de sequenciamento 29, 52
tela sequencing (sequenciamento) 24
tela welcome 11
telas de configuração da execução 25
  banco de dados 22
  estudo de caso 22
teste de volume 72

V

volumes de limpeza 74

W

Windows, minimizar para 19

Assistência técnica

Para obter assistência técnica, entre em contato com o suporte ao cliente da Illumina.

Tabela 3 Informações de contato gerais da Illumina

Site	www.illumina.com
E-mail	techsupport@illumina.com

Tabela 4 Illumina Números de telefone do suporte ao cliente

Região	Número de contato	Região	Número de contato
América do Norte	1.800.809.4566	Holanda	0800.0223859
Alemanha	0800.180.8994	Itália	800.874909
Austrália	1.800.775.688	Irlanda	1.800.812949
Áustria	0800.296575	Noruega	800.16836
Bélgica	0800.81102	Nova Zelândia	0800.451.650
Dinamarca	80882346	Reino Unido	0800.917.0041
Espanha	900.812168	Suécia	020790181
Finlândia	0800.918363	Suíça	0800.563118
França	0800.911850	Outros países	+44.1799.534000

Ficha de dados de segurança

As fichas de dados de segurança (SDSs) estão disponíveis no site da Illumina, no link support.illumina.com/sds.html.

Documentação do produto

No site da Illumina, há documentação do produto em PDF disponível para download. Acesse support.illumina.com, selecione um produto e clique em **Documentation & Literature (Documentação e literatura)**.

Componente # 15050524 Rev. C PTB

Preço: US$ 50,00

Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Califórnia 92122 E.U.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fora da América do Norte)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com